

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

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

研究要旨 ヒト CYP3A4 誘導能を評価するレポーターアッセイ系やヒト CYP2C19 遺伝子の一次構造と酵素活性の関係を調べる実験系を開発した。また、抗糖尿病薬や抗悪性腫瘍薬の服用患者での CYP2C9 および CYP3A4 による代謝能の個人差と薬理作用の関係について検討した。

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

A. 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、齧歯類等の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、本研究においては遺伝子組換え酵素やヒト遺伝子を組み込んだ培養細胞を用いた *in*

vitro 研究や被験者の遺伝情報や背景因子を考慮した臨床薬物動態研究などの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。

B. 研究方法

本研究におけるヒト組織を用いる研究および臨床研究はすべて各研究者が所属する研究機関に設置されている研究倫理委員会によって実施の許可を得ている。実際の実験実施にあたっては被験者に十分な実験内容に関する説明をした後、被験者から文書による自発的な同意を得た。

(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 μM）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。

(2) グリメピリドの薬物動態パラメーターに対する CYP2C9 遺伝型の影響

グリメピリドの臨床薬物動態試験に参加した被験者の選抜は CYP2C9 の遺伝型の他に、肝機能および腎機能が正常で、CYP2C9 の代謝基質となる併用薬を服用していない等を考慮した。被験者には午前 7 時から午前 9 時まで間に 100 mL 以上の水とともにグリメピリド 1mg を服用してもらい、服用前および服用後 45 分、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、10 時間の時点で、末梢血を 3mL 採血し血漿グリメピリド濃度を測定した。各時点での血漿中濃度から WinNonLin Ver5.0 解析ソフトを用いて薬物動態パラメーターを算出した。

(3) 抗悪性腫瘍薬イレッサ投与による代謝酵素誘導の検討

イレッサによる化学療法を受けることが前提となっている非小細胞肺癌で、文書による同意が得られた患者を対象として、イレッサ投与前、投与開始 12～16 日後、投与開始 26～30 日後の 3 回において、随時尿 20ml を採取し、6β-hydroxycortisol と free-cortisol を測定した。また、同スケジュールにおいてイレッサ血中濃度測定のための採血を実施した（投与開始 12～16 日後、投与開始 26～30 日後の 2 回はイレッサ内服直前に採血を実施）。さらに、一部の症例においては、イレッサ投与前、26～30 日後に hydrocortisone 負荷後の 24 時間尿を採取し、尿中 6β-OHF 排泄量を測定した。予定症例数は 40 例とした。

(4) CYP2C19 の一次構造と基質特異性に関する検討

CYP2C9、2C19、2C43 および 2C9 の 16 ヶ所に 2C19 型のアミノ酸を導入した変異体(16a.a)を大腸

菌で発現させ、精製を行った後(S)-mephenytoin 水酸化活性、tolbutamide *p*-methyl 水酸化活性を測定した。

C. 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

CYP3A4 はヒトにおける主要な薬物代謝酵素であり、薬物相互作用の原因となることが知られていることから CYP3A4 のヒト型誘導を予測することが重要視されている。CYP3A4 遺伝子には PXR (pregnane X receptor)を介して転写活性化に関与する領域として ER-6(everted repeat separated by six nucleotides)よりもさらに上流の 7kbp 付近に dNR(distal nuclear receptor-binding element)領域が存在することが明らかにされている。そこで、この領域を-362～+11bp の上流に挿入した組換えアデノウイルス AdCYP3A4-362-7k 及びヒト PXR の発現ウイルス AdhPXR を作製し、誘導剤による転写活性化をより確実に検出することのできるアッセイ系の開発を試みた。組換えアデノウイルス AdCYP3A4-362-7k をヒト新鮮肝細胞に感染させて、各種 CYP3A 誘導剤による CYP3A4 遺伝子の転写活性化がヒト新鮮肝細胞内で観察されるかどうかを検討した。その結果、リファンピシンおよびクロトリマゾール処理によって CYP3A4 遺伝子の転写活性化が認められたが、デキサメサゾンは転写活性化が認められる細胞(ドナー1)と認められない細胞(ドナー2)が観察された。ヒト新鮮肝細胞での結果は HepG2 細胞で得られた結果と比較的類似していた。AdCYP3A4-362-7k と AdhPXR を同時に HepG2 細胞に感染させて、種々の化合物について CYP3A4 遺伝子の誘導能を検討した。得られた結果をリファンピシン 10 μM での誘導能を++ (強い誘導能)として 5 段階評価し、表 1 にまとめた。薬剤ではリファンピシン (抗生物質)、クロトリマゾール (抗真菌薬)に強い誘導能が認められ、グリベンクラミド (糖尿病治療薬)、オメプラゾール(抗潰瘍薬)、エトポシド (化学療法作用薬)、ステロイド剤(デキサメサゾン、

れた。生体内物質であるテストステロン、エストロン、プロゲステロン、エストラジオール、プレグネノロン、ステロイドホルモンの類縁化合物、胆汁酸類にも誘導が認められた。

(2)グリメピリドの薬物動態パラメーターに対する CYP2C9 遺伝型の影響

抗糖尿病薬グリメピリドによる低血糖の発症メカニズムの解明と予防を目的として、薬物代謝酵素の遺伝的多型がグリメピリドの薬物動態に与える影響について検討した。グリメピリドは主に CYP2C9 によって代謝不活性化されることが知られていることから、2型糖尿病と診断されグリメピリドの処方を受けている患者のうち、文書による本研究への参加意思を表明した140名の CYP2C9 遺伝子型について TaqManPCR 法を用いて解析した。その結果、2名の CYP2C9*1/*3 遺伝子型を有する患者を見いだした。CYP2C9*2 遺伝子型は日本人を含む東洋人ではこれまでに見いだされていないことから、残りの138名の遺伝子型は CYP2C9*1/*1 であると推定される。CYP2C9*1/*3 型被験者（男性1名、女性1名）および CYP2C9*1/*1 型被験者（男性2名、女性2名）にグリメピリド1mgを服用してもらい、経時的に8時間後（一部は6時間後あるいは10時間後）まで採血し血漿中グリメピリド濃度を測定した（図1）。測定した血漿中濃度から薬物動態モデルに依存しない解析方法と one-compartment モデルを使用した解析方法を用いて薬物動態学的パラメーターを算出した。その結果、表に示すようにいずれの解析方法を用いた場合でも、CYP2C9*1/*3 型被験者の AUC は CYP2C9*1/*1 型被験者の2～3倍程度に増加しており、クリアランスは半分程度にまで減少していた。以上の結果より、CYP2C9*1/*3 型被験者においてはグリメピリドの消失速度が低下し、体内で長時間にわたって高い血中濃度が維持されていることがわかった。グリコヘモグロビン（HbA1c）値を血糖コントロールの指標としてグリメピリドの薬効を評価した。すなわちグリメピリドが処方される前と投与中の6ヶ月間の平均

HbA1c 値を CYP2C9*3 をヘテロ体で有する患者（CYP2C9*1/*3）と用量や服用条件が同じ野生型（CYP2C9*1/*1）の患者で比較検討した（図2）。その結果、CYP2C9*1/*3 患者における投与前 HbA1c は10.7%で、投与後平均 HbA1c は5.8%で4.9%の低下がみられた。一方、CYP2C9*1/*1 遺伝型を有する患者での投与前後の HbA1c 値の変動は平均すると1.8%であり、CYP2C9*1/*3 患者においてはグリメピリドの血糖低下作用が CYP2C9*1/*1 患者より強く発現していることがわかった。

(3) 抗悪性腫瘍薬イレッサ投与による代謝酵素誘導の検討

イレッサ（gefitinib）は、上皮成長因子受容体（EGFR：epidermal growth factor receptor）のチロシンキナーゼ阻害剤であり、EGFR 下流のシグナル伝達経路を遮断することにより抗腫瘍効果を発揮すると考えられている経口抗悪性腫瘍薬である。イレッサは前臨床試験において CYP3A4 で代謝されることが明らかにされている。一方、CYP3A4 は、デキサメサゾン、リファンピシンなどにより酵素誘導を、ケトコナゾールなどの抗真菌剤により酵素阻害を受けることが知られているが、イレッサ自身による酵素誘導または阻害の有無・程度については明らかにされていない。イレッサは非小細胞肺癌に対する有望な薬剤であり、また従来の抗悪性腫瘍薬にみられる骨髄毒性がきわめて少ないことより、今後、docetaxel, paclitaxel など CYP3A4 で代謝される他の抗悪性腫瘍薬との併用も行われるものと考えられる。さらに、CYP3A4 で代謝される薬剤（一般薬）は抗悪性腫瘍薬以外にも数多くあり、合併症および多彩な臨床症状を有するがん患者においてはこれらの一般薬の使用は少なからず起こりうるものと予想される。このため、イレッサと一般薬との併用における薬剤相互作用の有無・程度を勘案する上においてもきわめて重要な知見となりうる。

CYP3A4 の個体内変動（酵素誘導・阻害）の評価手法としては、尿中6β-hydroxycortisol (OHF) と尿中 free-cortisol (FC) の比（6β-OHF/FC）を検討する方法がある。これは、体内コルチゾール

(cortisol)が CYP3A4 で代謝され、 6β -OHF として尿中に排泄されることを利用したものであるが、尿を検体に用いるため非侵襲的であり、さらに随時尿による評価が可能のため、きわめて簡便かつ実用的である。そこで、本研究の目的は、イレッサによる化学療法を受ける非小細胞肺癌患者を対象として、尿中コルチゾール代謝物の測定から CYP3A4 の誘導・阻害の有無・程度、さらには有害事象の頻度・程度との関係について検討するものである。2003年10月20日より症例登録を開始、2004年1月末現在、12例の登録が完了、試験進行中である。登録された12例の患者背景としては、男性/女性：4/8、年齢中央値(range)：66(50-80)、PS 0/1：5/7、腺癌/扁平上皮癌/その他：10/1/1、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1、7例で、5例は未化学療法例であった。現在、症例登録継続中であり、有害事象、効果、尿中 6β -hydroxycortisol 値など結果については集積中の段階である。

(4) CYP2C19 の一次構造と基質特異性に関する検討

クローニングした新規 CYP 分子種であるサル型 CYP2C43 はヒト型 CYP2C19 と 90% のアミノ酸相同性を示し (*S*)-mephenytoin 4'-水酸化活性は CYP2C19 の約 10% であった。そこで CYP2C9、2C19、2C43 遺伝子の一次構造を比較し、CYP2C19 と CYP2C43 に共通に存在し、CYP2C9 では置換されているアミノ酸残基 16 ヶ所について活性に対する影響を調べた。まず、CYP2C9 の 16 ヶ所に CYP2C19 型のアミノ酸を導入した変異体(16a.a) について (*S*)-mephenytoin 4'-水酸化活性を測定したところ、CYP2C9 変異体(16a.a)で CYP2C19 に比べ、3%ながら活性が認められた。また、CYP2C9 変異体(16a.a)の変異を更に CYP2C9 型に 1 アミノ酸ずつ戻した変異体(15a.a)では、15a.a-99I、15a.a-286S、15a.a-442G で (*S*)-mephenytoin 4'-水酸化活性が低下した (図 3)。CYP2C9 変異体 ((15a.a)について tolbudamide *p*-methyl 水酸化活性を測定した結果、15a.a-91I、15a.a-237V、15a.a-286S では、もとの CYP2C9、2C19 より高い

活性を示した。以上の結果から、これらの部位がこの活性発現に必要であることが確認された

D. 考察

肝臓検体を採取して酵素活性や mRNA 量などを測定するような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、遺伝子組み換え酵素や培養細胞を用いて、ヒト薬物代謝特性を解析する実験系の開発を目指した。また、様々な患者背景因子を指標として用いることによってヒト薬物代謝特性を推定するための臨床試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。その結果、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 AdCYP3A4-362-7k とヒト PXR を発現する組換えアデノウイルス AdhPXR を併用すると薬物による CYP3A4 遺伝子誘導能の検出感度が向上することが判明した。*in vitro* アッセイ系では培養細胞を用いるため、培養細胞で認められる反応がヒト肝細胞においても同様に認められるかどうかを検証した。ヒト新鮮肝細胞を用いたレポーターアッセイの結果は HepG2 細胞で得られた結果と比較的類似しており、ヒト新鮮肝細胞の代用としてヒト肝癌由来の HepG2 細胞を試験系に用いることは有用であると考えられた。次いで、HepG2 細胞に AdCYP3A4-362-7k と AdhPXR を同時に感染させる *in vitro* レポーターアッセイ系を用いて種々の化合物をスクリーニングした。その結果、薬剤だけでなくステロイドホルモンやその類縁化合物、胆汁酸類も CYP3A4 遺伝子の転写活性化作用を有することが明らかとなった。ヒトにおける CYP3A4 誘導をより正確に反映する *in vitro* 評価系の確立には、転写調節シスエレメントや転写因子の解明など多くの解決しなければならぬ問題が残っているが、本評

価系は薬物のもつ CYP3A4 誘導能を予備的に評価する実験系として利用できる可能性が示された。以上、本研究より得られた知見は薬物の CYP3A4 遺伝子誘導能を評価することのできる高感度のアッセイ系の実用化に役立つものと考えられ、ヒト CYP3A4 誘導の分子機構解明の一助となると思われる。また、本評価系は CYP の他の分子種へも応用可能であるため、さらなる発展が期待される。

次に、新たにクローニングしたカニクイザル CYP2C 分子種の一次構造と酵素活性に関する知見から、ヒト CYP2C9 と CYP2C19 の一次構造と基質特性に関する検討を行った。今回の研究からアミノ酸の置換により、CYP2C9 および 2C19 基質特異性に関与する残基が、基質により異なることが明らかとされた。また、これまで考えられた基質認識部位以外の領域でも活性に影響があることが明らかとなった。この研究成果は立体構造と基質特異性を明らかにするための新たな情報を提供すると思われ、今後ヒトでの CYP2C による代謝反応を *in vitro* やコンピューター上で推定する方法に応用可能と考えられた。

患者での遺伝的背景を含む患者背景因子が薬物代謝活性に与える影響を調べることが可能な臨床薬物動態試験の開発を試みた。まず、薬物代謝酵素の遺伝的多型が抗糖尿病薬グリメピリドの代謝および薬理作用の発現に与える影響について調べるため臨床薬物動態試験を行った。その結果、CYP2C9*3 遺伝子型を保有する患者では、グリメピリドの代謝活性の低下と血糖降下作用の増強が認められた。従って、グリメピリドの投与による低血糖を未然に防いで安全に使用するためには、CYP2C9 遺伝子の多型解析はきわめて有用であることが明らかになった。

イレッサによる化学療法を受ける非小細胞肺癌患者を対象として、尿中コルチゾール代謝物の測定から CYP3A4 の誘導・阻害の有無・程度、さらには有害事象の頻度・程度との関係について検討するための準備を行った。現在、症例登録継続中であり、結論的なことは得られていないが、本試験によりイレッサ投与に伴う酵素誘導の有無・程度が判明すれ

ば、将来的に実施されうる docetaxel, paclitaxel など CYP3A4 で代謝される抗悪性腫瘍薬との併用、および他の一般薬との併用における薬剤相互作用の有無・程度の検討において大いに役立つものと期待される。

E. 結論

本研究課題においては、*in vitro* から臨床薬物動態研究までの広範な実験系を用いて、ヒト薬物代謝特性を解析した。その結果、*in vitro* 実験からは特定の薬物代謝酵素分子種での構造活性相関や誘導特性を比較的簡便に解析することが可能であることが示された。また、臨床薬物動態研究からは、患者背景因子や遺伝子情報を用いることによって個別の患者でのヒト薬物代謝特性を推定することが可能であることが示された。これらの実験系を組み合わせることによって、ヒトでの医薬品の代謝特性をより正確に推定することが可能になると考えられた。

F. 研究発表

- (1) Saeki M, Saito Y, Jinno H, Tohkin M, Kurose K, Kaniwa N, Komamura K, Ueno K, Kamakura S, Kitakaze M, Ozawa S, Sawada J. Comprehensive UGT1A1 genotyping in a Japanese population by pyrosequencing. Clin Chem. 49(7):1182-5 (2003)

G. 知的所有権の取得状況

無し

表1 CYP3A4-inducibility of various compounds summarized from the result of experiments with AdCYP3A4-362-7k and AdhPXR in HepG2 cells

Compound	(μ M)	Inducibility	Compound	(μ M)	Inducibility
Dexamethasone	10	+	Progesterone	10	+
Rifampicin	10	++	Dehydroprogesterone	10	+
Clotrimazole	10	++	Hydroxyprogesterone	10	+
Phenobarbital	1000	+	Estradiol	30	++
Omeprazole	10	+	Deoxycorticosterone	3	+
Cimetidine	10	-	Deoxycortisol	50	+
Phenytoin	10	\pm	Pregnenolone	50	+
Etoposide	10	+	Hydroxypregnenolone	10	+
Flunisolid	10	+	Dehydroisoandrosterone	10	+
Glibenclamide	10	+	Deoxycholic acid	100	+
	100	+++	Chenodeoxycholic acid	30	+
Testosterone	3	+	Lithocholic acid	30	+
Methyltestosterone	10	+	Ursodeoxycholic acid	30	+
Estron	10	+	Cortisone	10	+
Corticosterone	10	\pm	4-Androstene-3,17-dione	10	+

+++ : very strong, ++ : strong, + : weak, \pm : not significant, - : negative

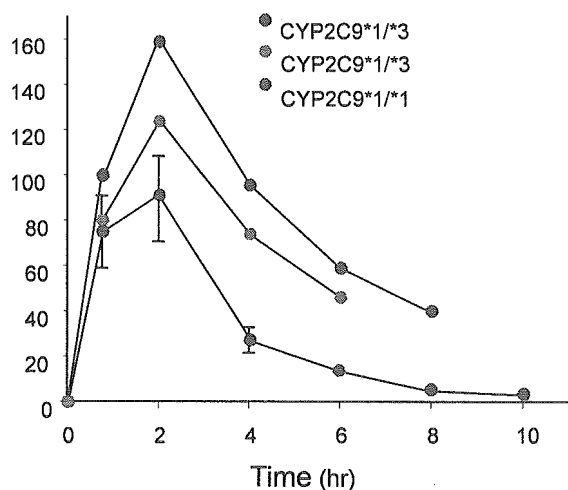


図1 グリメピリド服用患者での血中濃度の時間推移

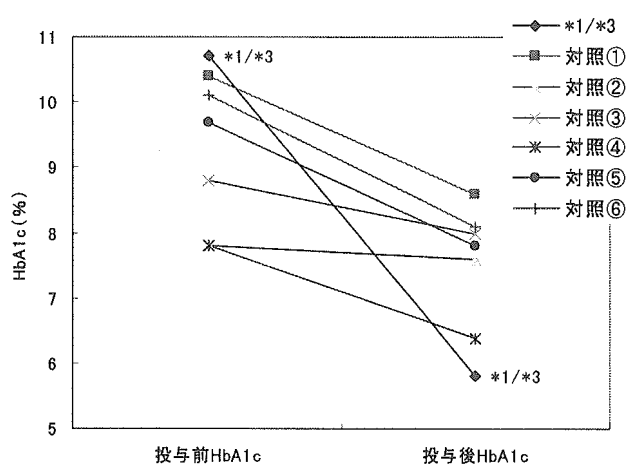


図2 グリメピリド単剤投与患者の HbA1c 低下

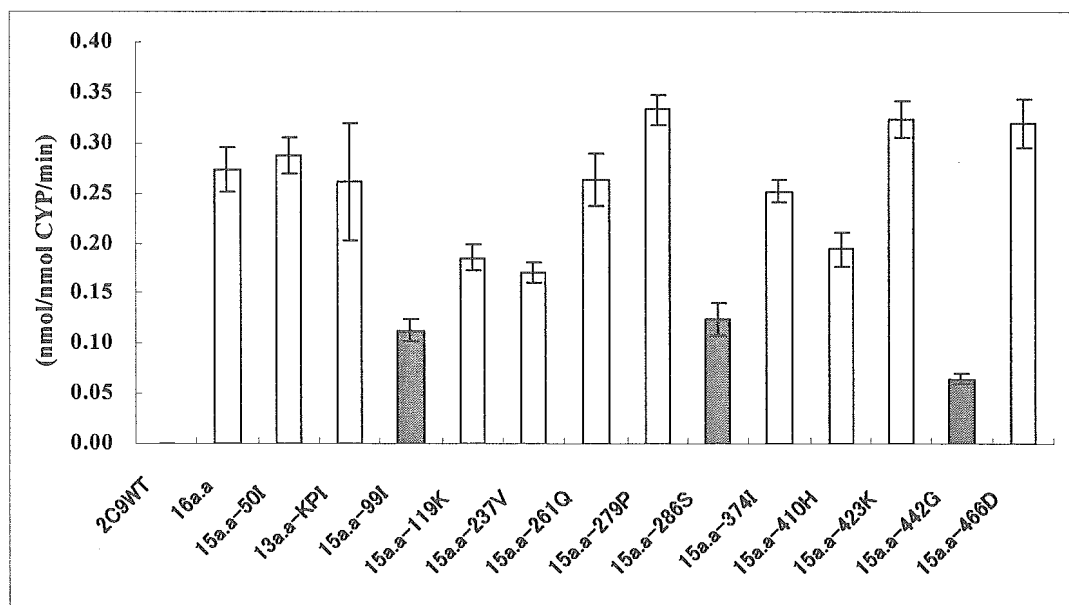


図3 精製 CYP2C9 変異体(15a.a.)の再構成系における (*S*)-mephenytoin 4'水酸化活性

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