

の違いは比較手法,シミュレーション条件,比較に用いる評価指標である.

## B. 研究方法:

提案法の概要を説明する.まず地域*i*の真の治療効果を $\theta_i$ とする( $i=1,\dots,K$ ).各地域の治療効果の点推定値 $\hat{\theta}_i$ はそれぞれ正規分布 $\hat{\theta}_i \sim N(\theta_i, \sigma_i^2)$ に従うと仮定する( $\sigma_i^2 = \sigma^2 * (1/N_{ic} + 1/N_{it})$ ).ここで $N_{it}$ と $N_{ic}$ はそれぞれ地域*i*の被験薬群,対照群の症例数である.ここで未観測母数 $\theta_i$ は独立に同一の分布 $N(M, A)$ に従うと仮定する.この仮定が経験ベイズ法を用いる際に必要である.この仮定が妥当であるかどうか評価する指標がEfron(JASA 1996:91:538-550)によって提案されている.この指標は2つの事前分布と興味のある地域( $i=1$ )の尤度を用いて計算される.1つ目の事前分布は仮定が妥当である下での事前分布 $g_A$ つまり $N(M, A)$ であり,もう1つは仮定が妥当でないときの事前分布 $g_B$ 例えば $N(M, \infty)$ である(本研究では $\infty$ は $10^4$ としている).経験ベイズ法では興味のある地域の真の治療効果 $\theta_1$ に対する事前分布の未観測母数MおよびAを推定する際には,興味のある地域以外の観測値 $\hat{\theta}_i (i=2,\dots,K)$ を用いる. $\hat{\theta}_i (i=2,\dots,K)$ と $\theta_i (i=2,\dots,K)$ の同時分布を $\theta_i (i=2,\dots,K)$ で積分消去し,周辺密度

$$\prod_{i=2}^K \frac{1}{\sqrt{2\pi(A+\sigma_i^2)}} \exp\left(-\frac{(\hat{\theta}_i - M)^2}{2(A+\sigma_i^2)}\right)$$

を得る.制限付き最尤法(REML法)によりこの式を制限付きに最大化する推定値 $\hat{M}, \hat{A}, \hat{\sigma}_i^2$ を得る.この推定値を興味のある地域の真の治療効果 $\theta_1$ の事前分布 $N(M, A)$ および $N(M, \infty)$ に代入し,それぞれ事後分布 $f_A(\theta_1 | data), f_B(\theta_1 | data)$ を計算する. $\theta_1$ の事前分布は $g_A$ または $g_B$ のいずれかであるため,それぞれを選択する事前確率を $h_A, h_B (=1-h_A)$ とする.これらの事前確率は解析者が指定する.それぞれの事前分布を選択する事後確率は,

$$h_A(\hat{\theta}_1) = h_A \int f_A(\theta_1 | data) d\theta_1 / d(\hat{\theta}_1)$$

$$h_B(\hat{\theta}_1) = h_B \int f_B(\theta_1 | data) d\theta_1 / d(\hat{\theta}_1)$$

となる.ただし,

$$d(\hat{\theta}_1) = h_A \int f_A(\theta_1 | data) d\theta_1 + h_B \int f_B(\theta_1 | data) d\theta_1$$

である.ベイズファクターとも呼ばれる事後確率

の比 $BF_{AB}(\hat{\theta}_1) = h_A(\hat{\theta}_1) / h_B(\hat{\theta}_1)$ が経験ベイズ法の仮定の妥当性を評価する指標である..本研究ではより精密に経験ベイズ法の仮定の妥当性を評価するため,

$$BF_{AB} = \min(BF_{AB}(\hat{\theta}_i), i=1,\dots,K)$$

を用いる.

ベイズファクターの解釈はJeffreys(Theory of Probability. Oxford, 1961)およびKass&Raffery(JASA,1995:90:773-795)で与えられており,それぞれベイズファクターが10以上,3以上となったときに,分子の状況すなわち経験ベイズ法の仮定が妥当であることに強い根拠があるとしている.本研究では $BF_{AB}$ の基準として3および10を採用する.

提案法の性能を評価するためにモンテカルロシミュレーションを行い,他の3つの方法と比較する.

- 1) 厚生労働省が例示する1つ目の方法の変法

$$\{\hat{\theta}_i / \hat{\theta}_{all} > 1/K, \text{ for all } i\}$$

以下,厚労省法1とよぶ.

- 2) 厚生労働省が例示する2つ目の方法

$$\{\hat{\theta}_i > 0, \text{ for all } i\}$$

以下,厚労省法2と呼ぶ.

- 3) Huangら(Pharm.Stat, 2013; 12: 59-64)が提案している経験ベイズ法に基づいた方法

本研究の提案法と同様に異なる2つの事前分布によって計算される2つの事後分布 $f_A(\theta_1 | data), f_B(\theta_1 | data)$ と $h_A, h_B$ を用いて混合分布を構成する.

$$f(\theta_1 | data) =$$

$$\frac{h_A f_A(\theta_1 | data) + h_B f_B(\theta_1 | data)}{\int \{h_A f_A(\theta_1 | data) + h_B f_B(\theta_1 | data)\} d\theta_1}$$

MおよびAはREML法ではなく,最尤法によって推定される.また,事後分布 $f_B(\theta_1 | data)$ の計算に用いる事前分布 $g_B$ は $N(0, \hat{A})$ とする.この混合分布が以下の式を満たす場合に $\theta_1$ は他の地域と一貫した治療効果を有すると判断する.

$$\int_0^{\infty} f(\theta_1 | data) d\theta_1 > 0.8$$

以下,Huang1と呼ぶ.

また,提案法との比較のために事前分布の設定 $g_B$ を提案法と同じ $N(M, \infty)$ として混合分布を構成するHuang2,Huang2のMとAの推定をREML法で行うHuang3も比較対照とした.

モンテカルロシミュレーションを以下の条件で実施する.

症例数設計:治療効果0.2(分散0.5)を有意水準両

側 5%, 検出力 90% で検出するために必要な症例数として 528 例.

地域数:  $K=3, 4, 10$

地域への症例配分比:

3A) (0.33, 0.33, 0.34)

3B) (0.10, 0.45, 0.45)

4A) (0.25, 0.25, 0.25, 0.25)

4B) (0.10, 0.10, 0.10, 0.70)

10A) (0.10 × 10)

10B) (0.025 × 8, 0.4 × 2)

対照群の乱数生成:  $X_{iCj} = \beta_i + \varepsilon_{iCj}$

$\beta_i \sim N(0, 0.01) \text{ iid}, \quad \varepsilon_{iCj} \sim N(0, 0.49) \text{ iid}$

被験薬群の乱数生成:  $X_{iTj} = \beta_i + \varepsilon_{iTj}$

$\beta_i \sim N(0, 0.01) \text{ iid}, \quad \varepsilon_{iTj} \sim N(0, 0.49) \text{ iid}$

A)  $\beta = (0.2 \times K)$

B)  $\beta = (0.1 \times K)$

C)  $\beta = (0 \times K)$

シミュレーション回数: 10000 回

評価指標: 一貫性証明同時確率

全地域を併合した際の Welch 検定で有意な治療効果が認められ, かつ一貫性あり/経験ベイズ法の仮定が妥当となった割合と定義する.

### C. 研究結果:

表 1 にシミュレーション条件別の各手法の一貫性証明同時確率を示す. Welch 検定の結果より有意水準 5%, 検出力 90% が保持されていることが確認できる. 全体的にみると, 提案法は基準値 3 と 10 でほぼ同じ結果となり, 地域数と症例数割合の変化による性能の低下は見られなかった. Huang3 もこれと同様の結果となった. 厚労省法 1 および 2 については地域数の増加, 不均一な症例数割合となることで性能が低下している. Huang1 および Huang2 は地域数の増加による性能の低下は見られなかったが, 不均一な症例数割合により性能が低下する傾向はみられた. 3 地域で症例数割合が均一の場合には提案法, Huang3 と厚労省法 2 は一貫性証明同時確率がほぼ同じであった. 真の治療効果が 0 の時の一貫性証明同時確率をみると, 提案法以外は 0.05 を大きく下回っており必要以上に保守的になっていた. そのため, 真の薬効が 0.2 の時の一貫性証明同時確率は Huang3 および (症例数が均一の場合の) Huang2 以外は検出力 90% を大きく下回った.

表 2 にはシミュレーション条件別に提案法と Huang1, 2, 3 の  $h_A=0.1$  および  $0.9$  の時の一貫性証明同時確率を示した. 基準値が 3 の提案法は, 3 地域および 4 地域の場合には一貫性証明同時確率は  $h_A$  によってほとんど変化しなかったが, 10 地域に

なると真の薬効が 0.2 の時に  $h_A$  によって大きく変化していた. 基準値が 10 の提案法では, 地域数にかかわらず  $h_A$  によって大きく一貫性証明同時確率が変化した, その影響は 10 地域の時に顕著であった. Huang1 もこれと同様な挙動を示した. Huang2 と Huang3 では  $h_A$  による変化はほとんど見られなかった.

### D. 考察:

本研究では昨年度の研究で提案した「経験ベイズ法に基づいた治療効果の一貫性評価のための新たな指標」を比較対照の手法, 評価指標, シミュレーション条件を変更して, より詳細に性能評価を行った. その結果, 3 地域で症例数の少ない地域がない場合には提案法, 厚労省が例示する 2 つ目の方法 (厚労省法 2), Huang らの提案する方法 (Huang2, 3) がいずれも同程度の性能であり, 一貫性評価に用いることが推奨される. しかしながら, 症例数割合が不均一になったり, 地域数が増加すると厚労省法 2 と Huang2 は性能が低下するため, 提案法または Huang3 によって一貫性評価を行うことが推奨される. また, 提案法および Huang らの提案する方法を利用する際には, 経験ベイズ法の仮定が妥当であるとする事前確率  $h_A$  を解析者が決定する必要がある. Huang2, 3 および地域数が少ない場合の提案法 (基準値 3) を利用する際には,  $h_A$  による変動はほとんどないため, 頑健性が保たれる. それ以外の場合には  $h_A$  によってある程度変動するため, 慎重に選択を行う必要がある. 多くの場合には無情報を表す 0.5 を用いることが適切であると考えられる.

### E. 健康危険情報:

該当項目なし

### F. 研究発表:

1. M. Takeuchi, H. Uno, A. Yoshida, M. Takeuchi, F. Takahashi, Statistical Analysis for Multi-National Clinical Trials in Inter-Variations among Regions, FDA/Industry Workshop, 2012 年 9 月, USA
2. 吉田顕臣, 高橋史朗, 竹内正弘, 地域一貫性指標に関する考察, RIMS 共同研究 Asymptotic Expansions for Various Models and Their Related Topics 研究会, 2013 年 3 月 4 日, 京都
3. 竹内正弘, 統計学的手法と民族差, 第 34 回日本臨床薬理学会学術総会 シンポジウム, 2013 年 12 月 5 日, 東京

### G. 知的財産権の出願・登録状況:

該当項目なし

H. 添付資料  
該当項目なし

表 1 指標ごとの一貫性証明同時確率

| 地域数 | 症例数割合             | 真の治療<br>効果 | 提案法 > 3<br>( $h_A=0.5$ ) | 提案法 ><br>10 ( $h_A=0.5$ ) | 厚労省法 1 | 厚労省法 2 | Huang1<br>( $h_A=0.5$ ) | Huang2<br>( $h_A=0.5$ ) | Huang3<br>( $h_A=0.5$ ) |
|-----|-------------------|------------|--------------------------|---------------------------|--------|--------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 3   | (.33,.33,.34)     | 0          | 0.053                    | 0.052                     | 0.015  | 0.021  | 0.012                   | 0.022                   | 0.026                   |
|     | (.33,.33,.34)     | 0.1        | 0.366                    | 0.359                     | 0.248  | 0.329  | 0.184                   | 0.305                   | 0.365                   |
|     | (.33,.33,.34)     | 0.2        | 0.895                    | 0.878                     | 0.731  | 0.865  | 0.506                   | 0.802                   | 0.9                     |
|     | (.1,.45,.45)      | 0          | 0.051                    | 0.05                      | 0.014  | 0.019  | 0.011                   | 0.028                   | 0.024                   |
|     | (.1,.45,.45)      | 0.1        | 0.366                    | 0.358                     | 0.23   | 0.291  | 0.159                   | 0.314                   | 0.363                   |
|     | (.1,.45,.45)      | 0.2        | 0.888                    | 0.868                     | 0.652  | 0.776  | 0.423                   | 0.778                   | 0.892                   |
| 4   | (.25,.25,.25,.25) | 0          | 0.052                    | 0.052                     | 0.012  | 0.017  | 0.017                   | 0.024                   | 0.025                   |
|     | (.25,.25,.25,.25) | 0.1        | 0.365                    | 0.358                     | 0.188  | 0.268  | 0.257                   | 0.328                   | 0.365                   |
|     | (.25,.25,.25,.25) | 0.2        | 0.887                    | 0.867                     | 0.626  | 0.777  | 0.676                   | 0.828                   | 0.892                   |
|     | (.1,.1,.1,.7)     | 0          | 0.048                    | 0.047                     | 0.009  | 0.011  | 0.007                   | 0.021                   | 0.023                   |
|     | (.1,.1,.1,.7)     | 0.1        | 0.366                    | 0.357                     | 0.174  | 0.224  | 0.13                    | 0.25                    | 0.371                   |
|     | (.1,.1,.1,.7)     | 0.2        | 0.883                    | 0.858                     | 0.522  | 0.656  | 0.365                   | 0.626                   | 0.899                   |
| 10  | 0.1*10            | 0          | 0.047                    | 0.045                     | 0      | 0.001  | 0.016                   | 0.024                   | 0.023                   |
|     | 0.1*10            | 0.1        | 0.368                    | 0.351                     | 0.016  | 0.027  | 0.236                   | 0.331                   | 0.36                    |
|     | 0.1*10            | 0.2        | 0.888                    | 0.848                     | 0.134  | 0.198  | 0.645                   | 0.846                   | 0.885                   |
|     | 0.025*8,0.4*2     | 0          | 0.048                    | 0.044                     | 0      | 0      | 0.009                   | 0.025                   | 0.024                   |
|     | 0.025*8,0.4*2     | 0.1        | 0.358                    | 0.33                      | 0.011  | 0.014  | 0.104                   | 0.22                    | 0.355                   |
|     | 0.025*8,0.4*2     | 0.2        | 0.862                    | 0.798                     | 0.049  | 0.066  | 0.289                   | 0.561                   | 0.875                   |

表 2  $h_A=0.1$  および  $0.9$  の時の一貫性証明同時確率

| 地域数 | 症例数割合             | 真の治療効果 | 提案法 > 3   |           | 提案法 > 10  |           | Huang1    |           | Huang2    |           | Huang3    |           |
|-----|-------------------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|     |                   |        | $h_A=0.1$ | $h_A=0.9$ | $h_A=0.1$ | $h_A=0.9$ | $h_A=0.1$ | $h_A=0.9$ | $h_A=0.1$ | $h_A=0.9$ | $h_A=0.1$ | $h_A=0.9$ |
| 3   | (.33,.33,.34)     | 0      | 0.05      | 0.054     | 0.043     | 0.054     | 0.008     | 0.016     | 0.021     | 0.022     | 0.026     | 0.026     |
|     | (.33,.33,.34)     | 0.1    | 0.344     | 0.37      | 0.301     | 0.368     | 0.123     | 0.219     | 0.304     | 0.304     | 0.363     | 0.365     |
|     | (.33,.33,.34)     | 0.2    | 0.845     | 0.904     | 0.74      | 0.901     | 0.388     | 0.552     | 0.801     | 0.793     | 0.896     | 0.9       |
|     | (.1,.45,.45)      | 0      | 0.049     | 0.052     | 0.049     | 0.051     | 0.007     | 0.016     | 0.023     | 0.031     | 0.023     | 0.024     |
|     | (.1,.45,.45)      | 0.1    | 0.344     | 0.37      | 0.301     | 0.369     | 0.105     | 0.224     | 0.28      | 0.333     | 0.358     | 0.363     |
|     | (.1,.45,.45)      | 0.2    | 0.834     | 0.9       | 0.727     | 0.896     | 0.306     | 0.559     | 0.707     | 0.815     | 0.882     | 0.89      |
| 4   | (.25,.25,.25,.25) | 0      | 0.05      | 0.053     | 0.044     | 0.053     | 0.015     | 0.02      | 0.023     | 0.026     | 0.025     | 0.025     |
|     | (.25,.25,.25,.25) | 0.1    | 0.342     | 0.37      | 0.342     | 0.369     | 0.224     | 0.286     | 0.324     | 0.336     | 0.362     | 0.365     |
|     | (.25,.25,.25,.25) | 0.2    | 0.829     | 0.896     | 0.707     | 0.893     | 0.616     | 0.719     | 0.821     | 0.839     | 0.886     | 0.891     |
|     | (.1,.1,.1,.7)     | 0      | 0.045     | 0.049     | 0.039     | 0.049     | 0.006     | 0.01      | 0.017     | 0.025     | 0.023     | 0.023     |
|     | (.1,.1,.1,.7)     | 0.1    | 0.341     | 0.374     | 0.293     | 0.371     | 0.107     | 0.159     | 0.228     | 0.262     | 0.368     | 0.371     |
|     | (.1,.1,.1,.7)     | 0.2    | 0.819     | 0.902     | 0.819     | 0.894     | 0.324     | 0.431     | 0.603     | 0.638     | 0.893     | 0.895     |
| 10  | (0.1*10)          | 0      | 0.04      | 0.048     | 0.024     | 0.048     | 0.012     | 0.021     | 0.023     | 0.024     | 0.023     | 0.023     |
|     | (0.1*10)          | 0.1    | 0.313     | 0.376     | 0.178     | 0.373     | 0.171     | 0.304     | 0.322     | 0.333     | 0.357     | 0.359     |
|     | (0.1*10)          | 0.2    | 0.753     | 0.907     | 0.429     | 0.901     | 0.499     | 0.777     | 0.824     | 0.853     | 0.879     | 0.883     |
|     | (0.025*8,0.4*2)   | 0      | 0.035     | 0.051     | 0.014     | 0.05      | 0.005     | 0.02      | 0.022     | 0.027     | 0.024     | 0.024     |
|     | (0.025*8,0.4*2)   | 0.1    | 0.27      | 0.37      | 0.098     | 0.365     | 0.068     | 0.181     | 0.203     | 0.23      | 0.346     | 0.356     |
|     | (0.025*8,0.4*2)   | 0.2    | 0.655     | 0.897     | 0.233     | 0.884     | 0.192     | 0.461     | 0.515     | 0.581     | 0.861     | 0.876     |

ヒト肝薬物代謝能の個人差・民族間差の原因解明に向けたステロール関連転写因子による  
ヒト CYP3A4 発現調節機序の解析

研究分担者 吉成 浩一 東北大学 准教授

**研究要旨：**

薬物代謝酵素の発現レベルには大きな個人間差、人種間差、民族間差が認められるが、その原因は必ずしも明確になっていない。栄養・生理状態の変化は肝 P450 発現に影響を与えることが知られていることから、私達は栄養素摂取量と P450 発現の関連性に関する解析を進め、マウスにおいて食餌性コレステロールの摂取量の減少は、肝 CYP3A11 発現レベルの低下を引き起こすことを明らかにした。そこで本分担研究では、ステロール応答性転写因子 LXR $\alpha$  および SREBP-2 によるヒト CYP3A4 の発現制御機構の解明を試みた。ヒト肝細胞における mRNA レベル変動解析および培養細胞を用いたレポーターアッセイの結果、LXR $\alpha$  の活性化は、異物応答性転写因子 PXR を介した CYP3A4 の発現を抑制し、これにはコアクチベーターの競合が関与する可能性が示された。また、この LXR $\alpha$  による遺伝子発現抑制は、他の PXR 標的遺伝子である CYP2B6 や CYP2A6 でも認められることが明らかになった。一方で、SREBP-2 の活性化は、ヒト肝細胞において CYP3A4 の発現を抑制することが示された。しかし、その抑制には、マウスとは異なり HNF-4 $\alpha$  は関与していない可能性が示された。以上の結果より、ヒトにおいても、肝細胞内コレステロールレベルの変化は、CYP3A4 遺伝子発現に影響を及ぼすことが強く示唆された。したがって、コレステロールや摂取量やその代謝・合成能力の差が、CYP3A4 発現レベルの個人差・民族間差を生じる一因となっている可能性が示された。

**A. 研究目的：**

薬物代謝は、医薬品の体内動態や薬効を決定する主要な要因である。その中心的役割を果たすのが第 1 相薬物代謝酵素チトクローム P450 (P450 または CYP) であり、ヒト P450 の 5 つの分子種 (CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4) は臨床使用されている医薬品の 7 割以上の代謝に関与することが知られている。これらの CYP 分子種の発現レベルには大きな個人差や人種・民族間差が認められる。その原因として、CYP2C9、CYP2C19 および CYP2D6 では遺伝的要因 (遺伝子多型) の寄与が大きいとされている。一方、CYP1A2 や CYP3A4 では後天的要因が大きいと考えられているが、その詳細は明確になっていない。

P450 の発現レベルは薬物暴露により増加することが古くから知られており、CYP1A2 の誘導には Ah 受容体が、CYP3A4 の誘導には PXR や CAR と呼ばれる核内受容体が中心的にはたらく。P450 の発現レベルはまた、疾病や栄養・生理状態の変化によっても影響を受けることが古くから知られているが、その分子機構は不明である。分担者のグループでは、栄養成分のうち、コレステロール摂取量の変化が、ステロール応答性の転写因子である SREBP-2 や LXR $\alpha$  を介してマウス肝における Cyp3a11 発現レベルに影響を及ぼすことを報告し

ている (*Mol Pharmacol*, 79: 148-156, 2011)。

食習慣の違いにより、食事成分の摂取量が個人間だけでなく民族間でも異なる可能性、また人種・民族により生体内コレステロール代謝能に差が認められる可能性があり、食事成分による P450 発現変動機構の解明は、これら薬物代謝酵素の発現レベルの個人間差・民族間差の原因解明に有用と思われる。そこで本年度は、マウスで得られた知見に基づき、ステロール応答性転写因子 LXR $\alpha$  および SREBP-2 によるヒト CYP3A4 の発現制御機構の解明を試みた。

**B. 研究方法：**

レポーターアッセイ

① LXR $\alpha$  による CYP3A4 遺伝子の発現調節：

既知の PXR 応答配列を含む、当研究室で既に作製した CYP3A4 遺伝子の luciferase レポーター遺伝子 (p3A4, *Mol Pharmacol*, 75, 677-684, 2009) を基に、各種欠失・変異プラスミドを作製した。ヒト LXR $\alpha$  発現プラスミド (*Toxicol Lett*, 215, 16-24, 2012)、PGC-1 $\alpha$  発現プラスミド (*Mol Pharmacol*, 75, 677-684, 2009) は当研究室で既に作製したものを、SRC-1 および GRIP-1 発現プラスミドは Promega より購入した。

② SREBP-2 による CYP3A4 遺伝子の発現調節：

CYP3A4 の CLEM および XREM 領域を pGL4.10 に挿入してレポーターコンストラクトを作製した。SREBP-2 発現プラスミドは当研究室で既に作製したものをを用いた (*Mol Pharmacol*, 75, 677-684, 2009)。

これらを利用して HepG2 細胞、HuH-7 細胞または LS174T 細胞でレポーターアッセイを行った。レポーター活性の測定には Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いた。

#### ヒト肝細胞における mRNA レベル測定

凍結ヒト肝細胞は Biopredic または Life Technologies から購入し、常法に従って融解、培養した。HepaRG 細胞は Life Technologies から購入し、説明書に従って融解・培養した。これら細胞を各種薬物で 48 時間処置した後、SV Total RNA Isolation System (Promega) および High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を利用して総 RNA 抽出と cDNA 合成を行った。定量的 PCR は GoTaq qPCR Master Mix (Promega) を用いて行った。

(倫理面での配慮)

ヒト肝細胞、ヒト肝由来試料を用いた実験に関しては、東北大学大学院薬学研究科ヒトを対象とする研究に関する倫理委員会の承認を受けて実施した。

### C. 研究結果：

#### 1. LXR $\alpha$ による CYP3A4 遺伝子の発現調節

前年度までに、LXR $\alpha$  は CYP3A4 遺伝子転写活性化作用を有しており、LXR $\alpha$  はヒト肝細胞における CYP3A4 の構成的発現に寄与している可能性が示された。一方で、LXR $\alpha$  の活性化は異物応答性転写因子 PXR を介した CYP3A4 誘導に対して抑制的に作用することが示唆された。

本年度はまず、PXR 依存的な遺伝子発現の LXR $\alpha$  の活性化による抑制が、CYP3A4 以外の遺伝子においても認められるか否かを明らかにするために、PXR アゴニスト rifampicin と LXR アゴニスト GW4965 で処置したヒト肝細胞における CYP2A6 および CYP2B6 の mRNA レベルを測定した (Fig. 1)。その結果、これら mRNA レベルは、いずれの肝細胞においても rifampicin 処置により増加したが、GW3965 の共処置により、その増加作用は消失した。

次に、LXR $\alpha$  による PXR 依存的な転写抑制の機序の解明を目指した。まず、この作用に何らかの細胞内因子が関与するか否かを明らかにするため、これまで使用していた HepG2 細胞とは異なる 2 つのヒト由来細胞 (ヒト肝癌由来 HuH-7 細胞およびヒト大腸がん由来 LS174T 細胞) を用いて、レポ

ーターアッセイを行った (Fig. 2)。その結果、HuH-7 細胞では、LXR $\alpha$  と PXR の単独の活性化は、CYP3A4 の転写を同程度亢進した。これは HepG2 細胞では PXR に比べて LXR $\alpha$  は著しく弱い転写活性化作用しか示さないことと異なっていた。また、HuH-7 細胞では、LXR $\alpha$  の活性化は PXR 依存的な CYP3A4 の転写を抑制したが、その程度は HepG2 細胞に比べて弱かった。一方、LS174T 細胞では、HepG2 細胞と同様に LXR $\alpha$  は PXR に比べて弱い転写活性化作用しか示さないかったが、PXR 依存的な転写を抑制しなかった。以上のことから、CYP3A4 発現に対する LXR $\alpha$  と PXR の寄与ならびに両転写因子のクロストークは、細胞依存的であることが明らかとなった。

そこで次に、LXR $\alpha$  と PXR の共通のヘテロダイマー形成パートナーである RXR $\alpha$ 、ならびに転写コアクチベーター (SRC-1、GRIP-1 および PGC-1 $\alpha$ ) の LXR $\alpha$  による PXR 依存的な転写抑制における役割を明らかにするために、これら因子の発現プラスミドを用いてレポーターアッセイを行った (Fig. 3)。その結果、LXR $\alpha$  による抑制作用は、RXR $\alpha$  を共発現しても認められたが、3 種のコアクチベーターを同時に発現した場合には消失した。

最後に、LXR $\alpha$  による抑制効果の酵素誘導評価における意義を明らかにするために、ヒト肝細胞を用いた CYP3A4 誘導評価とレポーターアッセイを利用した PXR 依存的 CYP3A4 転写活性化作用評価において、PXR アゴニストの rifampicin と PXR/LXR デュアルアゴニストの T0901317 の作用を比較した (Fig. 8)。その結果、T0901317 は、レポーターアッセイにおいて rifampicin に比べて強い PXR 活性化作用 (CYP3A4 転写活性化作用) を示したのに対し、ヒト肝細胞における CYP3A4 誘導作用は rifampicin に比べて弱かった。

#### 2. SREBP-2 による CYP3A4 遺伝子の発現調節

SREBP-2 が、CYP3A4 遺伝子の発現調節に寄与するか否かを明らかにするため、HepaRG 細胞をコレステロール (10  $\mu$ g/mL) および 25-ヒドロキシコレステロール (1  $\mu$ g/mL) で処置し、CYP3A4 と SREBP-2 の標的遺伝子 (*HMGCS1* および *LDLR*) の mRNA レベルを測定した (Fig. 5)。なお、上記ステロール混合物の処置により、内因性 SREBP-2 の活性が抑えられることが知られている。その結果、ステロール混合物の処置により、*HMGCS1* および *LDLR* の mRNA レベルは有意に低下したのに対し、CYP3A4 mRNA レベルは有意に上昇した。

CYP3A4 遺伝子の転写調節には、CLEM4 と呼ばれる構成的発現に関与するプロモーター領域および XREM と呼ばれる異物応答性発現に関与するプロモーター領域が重要とされている。そこで、こ

れら領域を含むレポーターコンストラクトと、活性型 (N 末端) SREBP-2 発現プラスミドを用いて、レポーターアッセイを行った (Fig. 6)。その結果、SREBP-2 は CLEM4 の領域を介して CYP3A4 遺伝子の発現を抑制することが示された。

さらに、SREBP-2 応答領域を同定するために、様々な長さの CLEM4 を含むレポーターコンストラクトを作製してレポーターアッセイを行った (Fig. 7)。その結果、SREBP-2 は、-11129 から -10423 の領域を介して *CYP3A4* の発現を抑制することが示された。

私達の研究室では、マウス *Cyp3a11* の SREBP-2 による抑制には、HNF-4 $\alpha$  が関与することを明らかにしている。しかし、今回同定した *CYP3A4* の SREBP-2 応答領域には、HNF-4 $\alpha$  結合配列や SREBP-2 結合配列は存在しなかった。そこで、この領域に作用する転写因子を同定するために、TESS (Transcription Element Search System, University of Pennsylvania) を用いてこの領域を検索したところ、2 つの C/EBP 結合配列を見出した (data not shown)。

### 3. 総括

本分担研究では、昨年度に引き続き、食事成分がヒト CYP3A4 の発現変動要因、すなわち個人間差や民族間差の原因となっている可能性を検討するため、コレステロールと CYP3A4 発現の関連性について、ステロール応答性転写因子であり、コレステロール過剰時にコレステロールレベルの低下に働く LXR  $\alpha$ 、およびコレステロール欠乏時にコレステロールの合成・取り込み亢進に働く SREBP-2 に着目して研究を行った。

本年度および昨年度得られた結果を併せて考えると、LXR  $\alpha$  の活性化は、異物応答性転写因子 PXR を介した *CYP3A4* の発現を抑制し、これにはコアクチベーターの競合が関与する可能性が示された。また、この LXR  $\alpha$  による遺伝子発現抑制は、他の PXR 標的遺伝子である *CYP2B6* や *CYP2A6* でも認められることが明らかになった。一方、SREBP-2 の活性化は、ヒト肝細胞において *CYP3A4* の発現を抑制することが示された。しかし、その抑制は、マウスとは異なり、HNF-4 $\alpha$  以外の因子を介して起こることが示唆された。

以上の結果より、ヒトにおいても、肝細胞内コレステロールレベルの変化は、CYP3A4 遺伝子発現に影響を及ぼすことが強く示唆された。したがって、コレステロールや摂取量やその代謝・合成能力の差が、CYP3A4 発現レベルの個人差・民族間差を生じる一因となっている可能性がある。

D. 健康危険情報：  
該当なし

E. 研究発表：  
学術論文

- 1 Watanabe K, Sakurai K, Tsuchiya Y, Yamazoe Y, Yoshinari K: Dual roles of nuclear receptor liver X receptor  $\alpha$  (LXR  $\alpha$ ) in the CYP3A4 expression in human hepatocytes as a positive and negative regulator. *Biochem Pharmacol.* 86:428-436, 2013.

招待講演

1. 吉成浩一：Role of sterol-responsive transcription factors in CYP3A gene expression. 日本薬物動態学会第28回年会、2013年10月11日 (東京)
2. 吉成浩一：薬物代謝酵素誘導に関わる転写調節因子の生理機能とその毒性学的意義. 日本薬学会第134年会、2014年3月29日 (熊本)

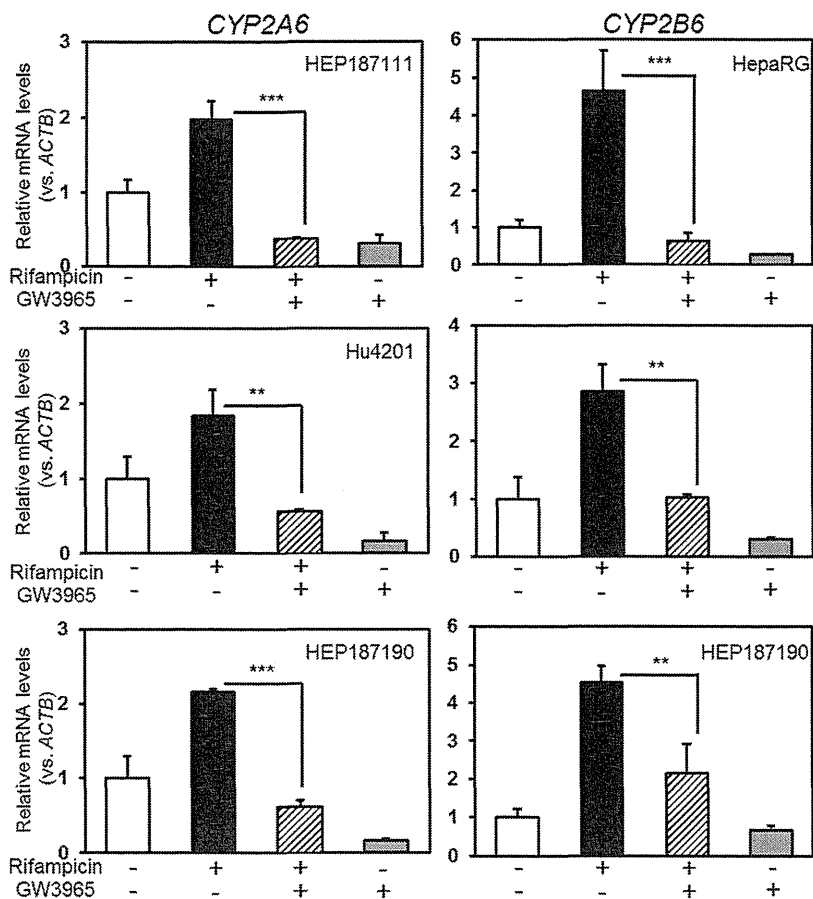
学会発表

1. 渡邊圭祐、櫻井香織、槌谷友里、山添康、吉成浩一：PXR 依存的な CYP3A4 遺伝子の発現は LXR  $\alpha$  により抑制される. 日本薬物動態学会第28回年会、2013年10月10日 (東京)
2. 櫻井香織、井上晋一、渡邊圭祐、山添康、吉成浩一：SREBP-2 を介した CYP3A4 遺伝子の転写抑制機構の解明. 第52回日本薬学会東北支部大会、2013年10月20日 (仙台)
3. 渡邊圭祐、櫻井香織、槌谷友里、山添康、吉成浩一：PXR 依存的な CYP3A4 遺伝子の発現は LXR  $\alpha$  により抑制される. 第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2013年11月24日 (仙台)
4. 櫻井香織、井上晋一、渡邊圭祐、山添康、吉成浩一：SREBP-2 を介した CYP3A4 遺伝子の転写抑制機構の解明. 第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2013年11月24日 (仙台)

F. 知的財産権の出願・登録状況：  
該当なし

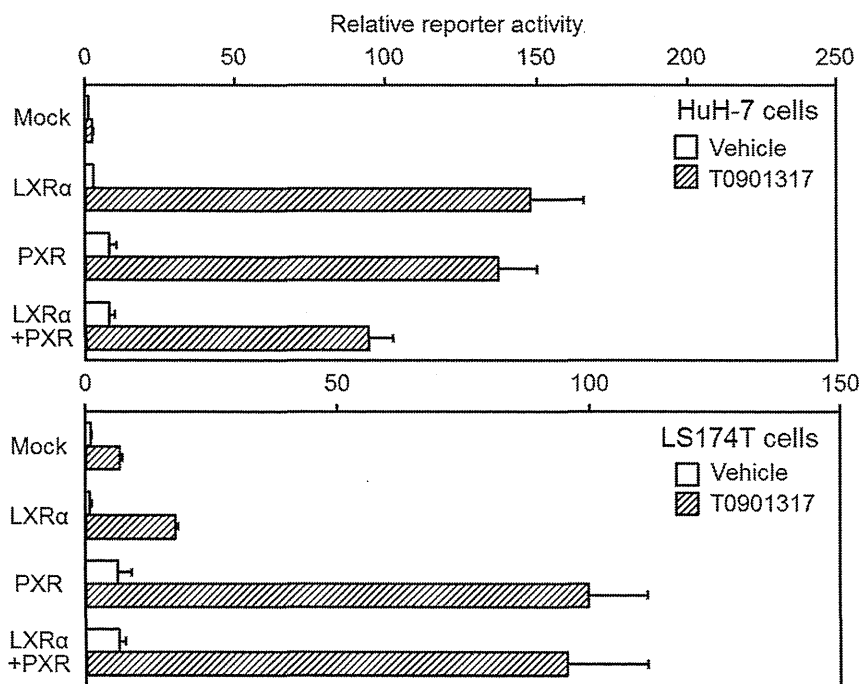
G. 添付資料  
なし





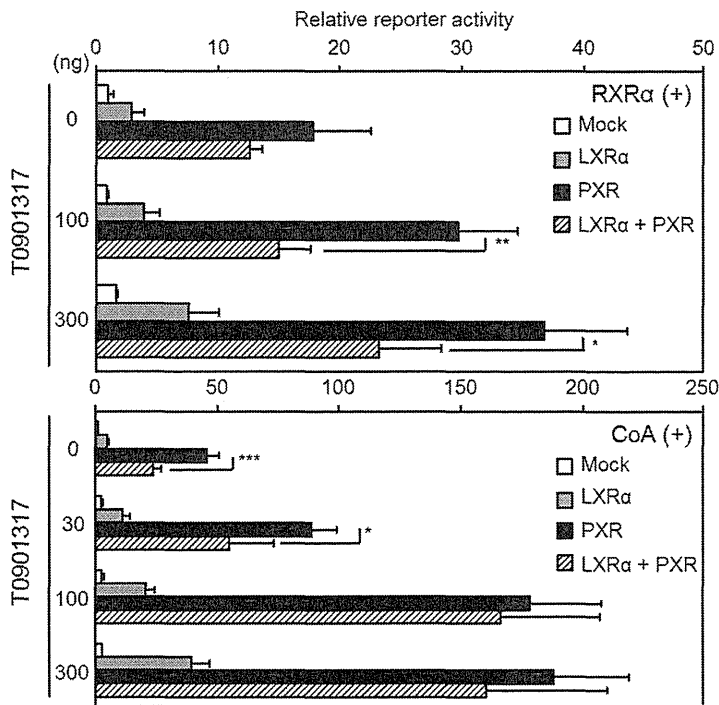
**Fig. 1. Influences of GW3965 treatment on *CYP2A6* and *CYP2B6* mRNA levels in human hepatocytes.**

Differentiated HepaRG cells (HPRGC1, #933777) and primary human hepatocytes (HEP187111, Hu4201, HEP187190) were treated with vehicle (0.2% DMSO) or rifampicin (10  $\mu$ M) in the absence or presence of GW3965 (2  $\mu$ M) for 48 h. *CYP2A6*, *CYP2B6* and *ACTB* mRNA levels were determined. The results are expressed as relative mRNA levels to those in vehicle-treated cells. Data are the mean  $\pm$  SD (n = 3-4). Experiments with HepaRG cells were carried out twice and representative data from one experiment are shown. Student's t-test was performed between two groups indicated; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .



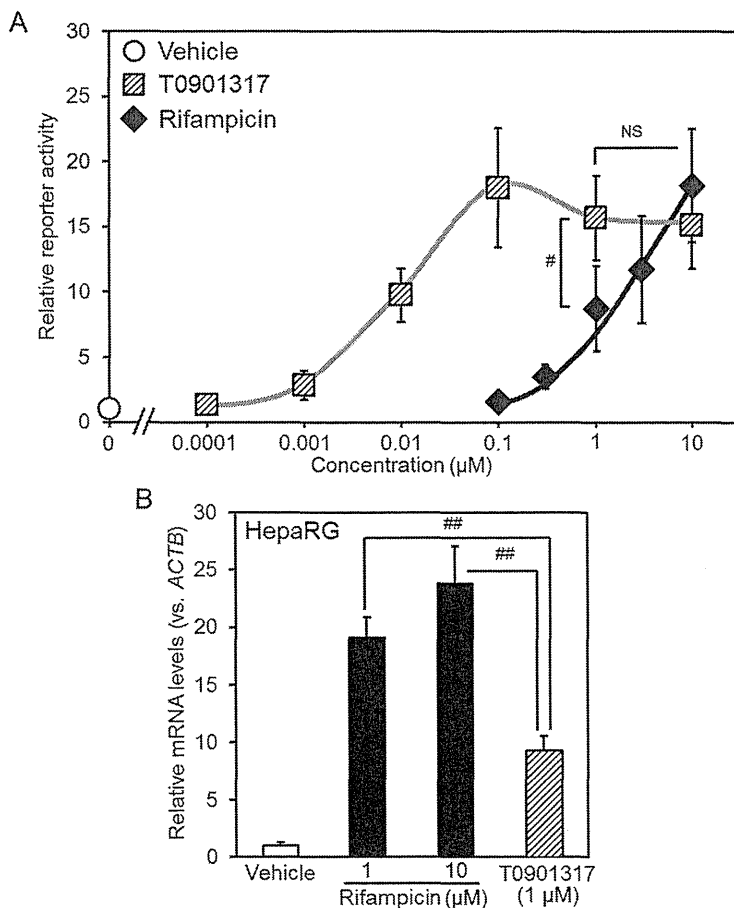
**Fig. 2. Influences of LXR $\alpha$  activation on the PXR-dependent *CYP3A4* transactivation in HuH-7 and LS174T cells.**

HuH-7 cells and LS174T cells ( $3 \times 10^4$  cells/well in 48-well plate) were transfected with p3A4 (0.5  $\mu$ g), phRL-TK (0.025  $\mu$ g) and expression plasmids (LXR $\alpha$ ; pTarget-hLXR $\alpha$  (0.05  $\mu$ g) and empty pTarget (0.05  $\mu$ g), PXR; pTarget-hPXR (0.05  $\mu$ g) and empty pTarget (0.05  $\mu$ g), PXR + LXR $\alpha$ ; pTarget-hPXR (0.05  $\mu$ g) and pTarget-hLXR $\alpha$  (0.05  $\mu$ g)). Twenty hours after transfection, the cells were treated with vehicle (0.2% DMSO), T0901317 (1  $\mu$ M), GW3965 (2  $\mu$ M) or rifampicin (10  $\mu$ M) for 48 h, and reporter activities were measured. Firefly luciferase activities were normalized with *Renilla* luciferase activities.



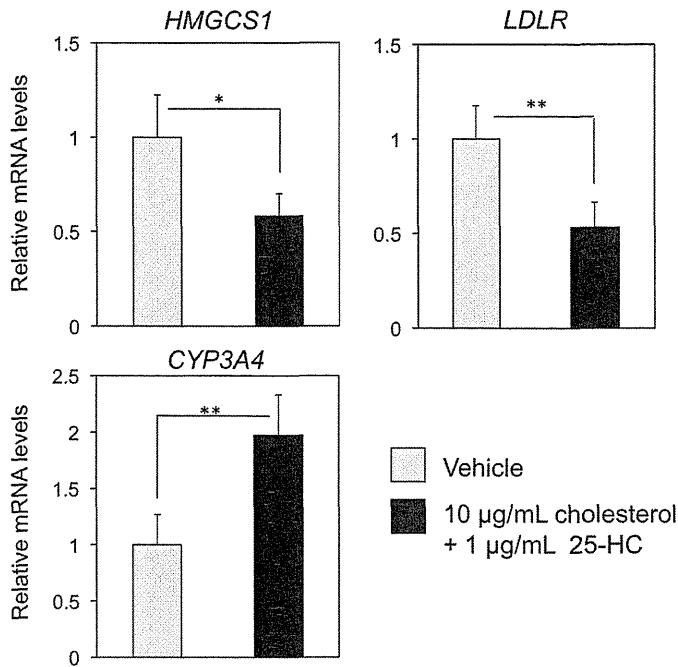
**Fig. 3. Influences of RXR $\alpha$  or coactivators on the inhibitory effects of LXR $\alpha$  in reporter assays**

HepG2 cells were seeded and transfected with plasmid DNA as in result 1 except that the increasing amount of RXR $\alpha$  expression plasmid or mixture of coactivator (SRC-1, GRIP-1 and PGC-1 $\alpha$ ) expression plasmids (CoA mix) were co-transfected. Twenty hours after transfection, the cells were treated with T0901317 (1  $\mu$ M) for 48 h, and reporter activities were measured. Firefly luciferase activities were normalized with *Renilla* luciferase activities. Data are expressed as relative activities to those in mock-transfected and T0901317-treated cells. Student's t-test was performed between two groups indicated; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

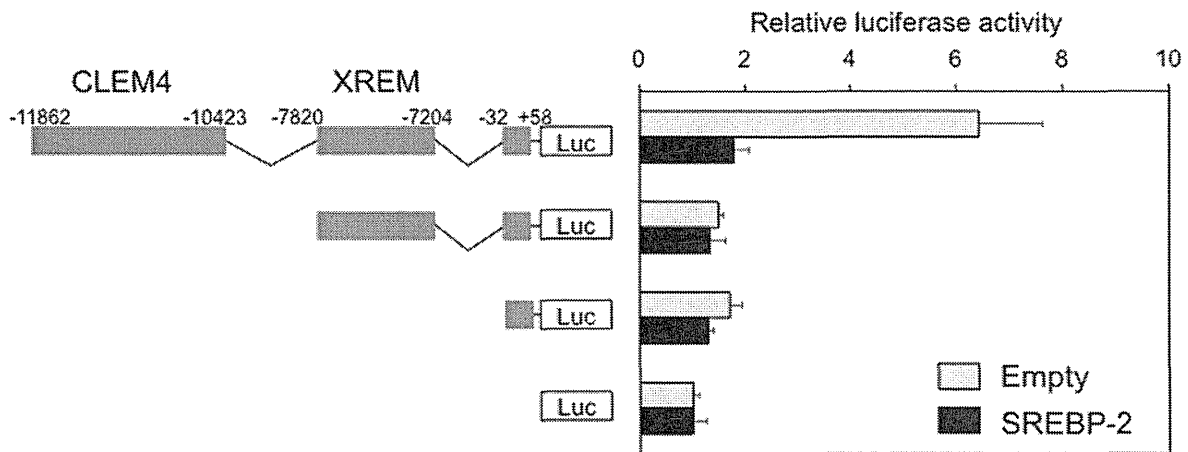


**Fig. 4. Influence of T0901317 treatment on *CYP3A4* reporter activities and *CYP3A4* mRNA levels in HepaRG cells.**

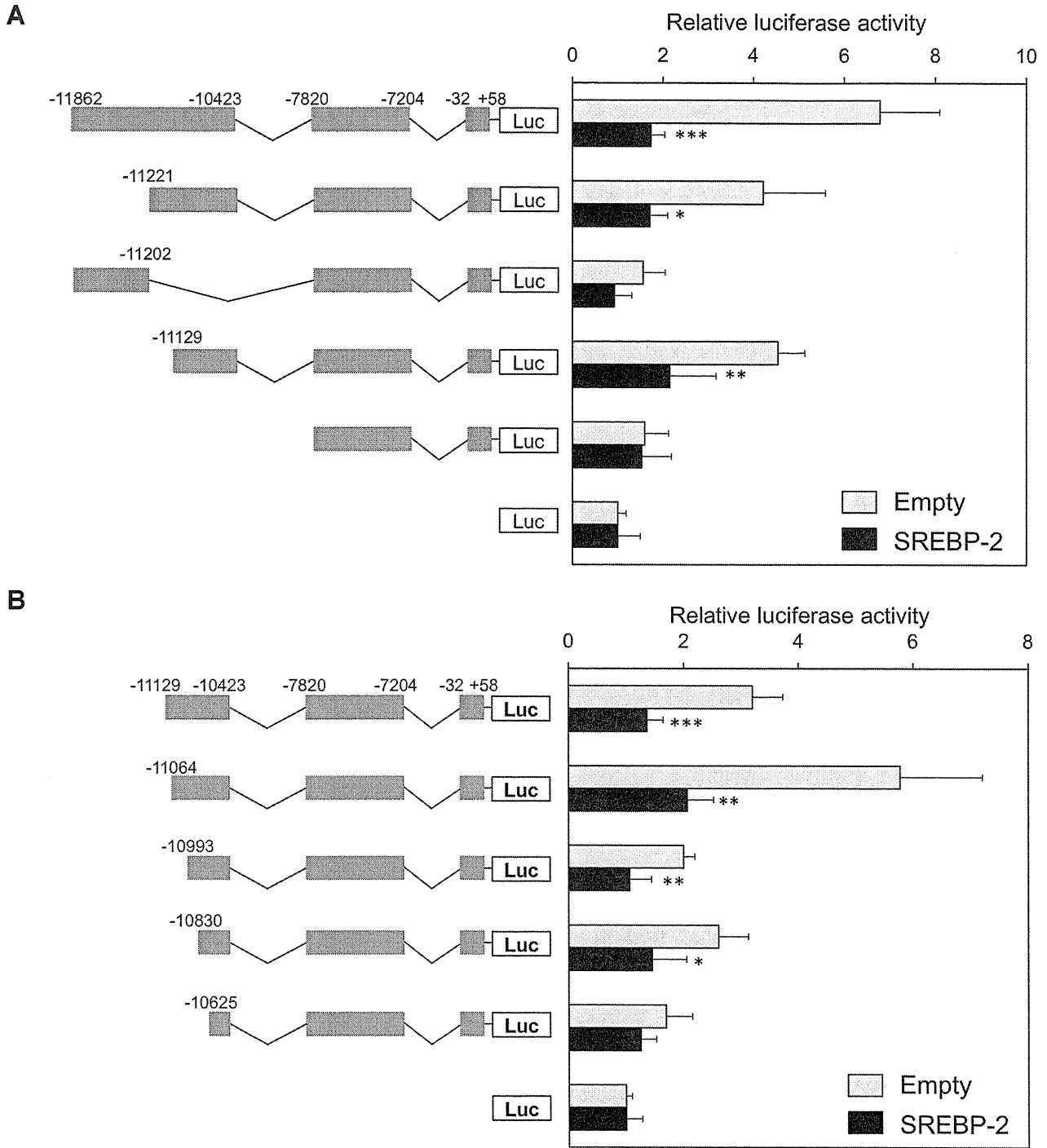
A. HepG2 cells ( $3 \times 10^4$  cells/well in 48-well plate) were transfected with pCYP3A4-362-7.7k (0.5  $\mu$ g), phRL-TK (0.025  $\mu$ g) and pTarget-hPXR (0.1  $\mu$ g). Twenty hours after transfection, the cells were treated with rifampicin (0.1–10  $\mu$ M) or T0901317 (0.0001–10  $\mu$ M) for 48 h, and reporter activities were measured. Firefly luciferase activities were normalized with *Renilla* luciferase activities. Data are expressed as relative activities to those in vehicle-treated cells. Data are the mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ) of one representative experiment from 3 independent experiments. B. Differentiated HepaRG cells (HPRGC10, #1224919), cultured as described in Materials and Method, were treated with vehicle (0.1% DMSO), rifampicin (1 or 10  $\mu$ M) or T0901317 (1  $\mu$ M) for 48 h. *CYP3A4* and *ACTB* mRNA levels were determined as described in Materials and Method. The results are expressed as relative mRNA levels to those in the vehicle-treated cells. Data are the mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). Experiments with HepaRG cells were carried out twice and representative data from one experiment are shown. #,  $P < 0.05$ ; ##,  $P < 0.01$ , significantly different from the corresponding T0901317 (1  $\mu$ M)-treated cells based on one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test; NS, not significant.



**Fig. 5. Influence of the treatment with cholesterol and 25-hydroxycholesterol (25-HC) on mRNA levels of *CYP3A4* and *SREBP-2* target genes.** HepaRG cells were treated with either vehicle (0.2% ethanol) or cholesterol (10 µg/mL) and 25-hydroxycholesterol (1 µg/mL). Total RNA of the cells were isolated and the mRNA levels were determined by quantitative reverse transcription-PCR. Asterisks represent significant differences: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01).



**Fig. 6. Influences of SREBP-2 activation on the *CYP3A4* transcription.** HepG2 cells were transfected with each reporter plasmid (0.2 µg), pRL-SV40 (0.001 µg) and either empty or SREBP-2 expression plasmid (0.01 µg). Eight hours after transfection, the cells were cultured in 10% FCS-containing medium for 40 h, and then harvested. Reporter activities in the cells were determined as described above.



**Fig. 7. Identification of the SREBP-2-responsive region in the *CYP3A4* promoter.**  
 Reporter assays were performed as in Fig. 6 using the reporter constructs shown on the left.

厚生労働科学研究費補助金  
(地球規模保健課題推進研究事業)

研究分担報告書

薬物応答性の民族差に関する研究

研究分担者：渡邊 裕司 (浜松医科大学医学部臨床薬理学 教授)  
研究協力者：山田 静雄 (静岡県立大学薬学部薬学科薬物動態学分野 教授)  
三坂 真元 (福島県立医科大学医学部薬理学講座 助教)

研究要旨：薬物応答性の民族差を生じる要因として、遺伝子多型などの内的因子と共に、習慣的に摂取する食物や飲料などの外的因子も関与することが知られている。特に日本人の場合は外的要因として緑茶の影響を検討することが重要である。本研究では、緑茶が降圧薬として用いられる $\beta$ 遮断薬ナドロールの薬物動態および薬効へ及ぼす影響を検討した。2週間の緑茶（高カテキン含有緑茶 700mL/日）飲用は、ナドロールの腎クリアランスを変化させることなく、ナドロールの $C_{max}$  および AUC をともに約 85%低下させた。また、緑茶飲用によりナドロールの血圧低下作用および心拍数低下作用は著明に減弱した。さらに薬物トランスポーターである OATP1A2 と OATP2B1 を発現する HEK293 細胞を用いた実験より、ナドロールが OATP1A2 の基質となり、緑茶は OATP1A2 阻害活性を有することが明らかとなった。これらの結果は、緑茶が OATP1A2 依存的なナドロールの腸管吸収を阻害することにより、ナドロールの血中移行を低下させ、薬効を減弱させる可能性があることを示している。本研究により、緑茶は薬物トランスポーターを介して医薬品の応答性を変化させ、薬物応答の民族差を生じる外的要因となることが強く示唆された。

A. 研究目的

薬物応答性に個体間差、民族差が存在し、その機序として薬物代謝酵素、薬物トランスポーター、薬物受容体や関連シグナル経路あるいは HLA の遺伝子多型などの内的要因が深く関わり、さらに、食事や文化などの外的要因も関与することが知られている。

近年、我が国の治験において国際共同治験の割合が増加し、海外と同一プロトコールで臨床試験を実施する機会が増大している。このような背景で、薬物応答に民族差が存在するのかが、存在したならばそれほどのような要因に由来するのかが明らかにすることは、今後わが国で国際共同臨床試験を実施していく上でも非常に重要である。

平成 21-22 年度「日中韓大臣声明に基づく医薬品の民族差に関する国際共同臨床研究」では、既存データから民族差が存在すると推測されたモキシフロキサシン、メロキシカム、シンバスタチン、モキシフロキサシンの血中濃度に、アジア人種間のみならず欧米人との間にも有意差は認められないことが明らかにされた。上記研究結果は、真の民族差を検討するためには、プロトコル、試験体制、検体測定、飲食物など外的変動要因を可能な限り統一することの重要性を強く示唆している。一方、日常における薬物応答は飲食物の嗜好など外的要因により修飾される可能性があり、これが広義の薬物応答の民族差の構成要素となりうるがその実態は明らかではない。

本研究では、日本人に飲用の機会が多い緑茶が薬物応答に及ぼす影響について検討し、民族差の外的要因となりうるのかを考察した。

## B. 研究方法

(1) 非臨床試験: 薬物トランスポーターである OATP1A2 と OATP2B1 を発現する HEK293 細胞を用い、 $[^3\text{H}]$ ナドロール取り込み試験を実施した。その結果、ナドロールは OATP1A2 の基質( $K_m=84.3\pm 1.0\ \mu\text{mol/L}$ ;  $V_{\max}=332.8\pm 125.5\text{pmol/min/mg protein}$ )となるが、OATP2B1 の基質とはならないことが明らかとなった。OATP1A2 発現細胞における $[^3\text{H}]$ ナドロール取り込みは、OATP1A2 阻害薬であるナリンジン、BSP およびベラパミルにより抑制された。緑茶成分であるエピガロカテキングレート(EGCG)は濃度依存性に OATP1A2 依存的なナドロールの取り込みを阻害した( $IC_{50}=37.3\pm 5.9\ \mu\text{mol/L}$ )。

さらに臨床研究で使用した緑茶も濃度依存性に OATP1A2 依存的なナドロールの取り込みを阻害した( $IC_{50}=1.36\pm 0.04\%:50\%$ 抑制には緑茶を 1.36:100 で希釈)。

(2) 臨床試験: 試験はランダム化クロスオーバー法を用い、文書同意が得られた 10 名の日本人が試験に参加した。被験者は、緑茶(ヘルシア緑茶, Kao)またはミネラルウォーターをそれぞれ 14 日間飲用し、その翌朝 30mg のナドロールを 350mL の緑茶あるいはミネラルウォーターで内服し、ナドロール投与後の 30 分間でさらに 350mL の緑茶あるいはミネラルウォーターを飲用した。ナドロール投与前、投与後 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、24.0、48.0 時間のナドロールの血中濃度と血圧および心拍数の変化を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言に基づき、また「臨床研究の倫理指針」、「ゲノム薬理学を適用する臨床研究と審査に関するガイドライン」に則り実施した。すべての被験者から文書による同意を取得した。

## C. 研究結果

本研究で使用した緑茶には、エピカテキン(EC)、エピガロカテキン(EGC)、エピカテキングレート(ECG)、エピガロカテキングレート(EGCG)がそれぞれ $\sim 80,240,130,460\ \mu\text{g/mL}$ 含まれていた。すなわち緑茶 700mL/日の飲用により、EC, EGC, ECG, EGCG が 56, 168, 91, 322mg それぞれ摂取される。2 週間の緑茶 (700mL/日) 飲用は、ナドロールの腎クリアランスを変化させることなく、

ナドロールの Cmax を 85.3%(range: ミネラルウォーター投与時の 4.6-50.4%, P=0.007)、および AUC を 85%(range: ミネラルウォーター投与時の 6.8-37.6%, P<0.001)低下させた。また、緑茶飲用によりナドロールの血圧低下作用および心拍数低下作用は著明に減弱した。

#### D. 考察

本研究により、緑茶およびその含有成分である EGCG が薬物トランスポーター OATP1A2 を阻害し、OATP1A2 依存的なナドロールの腸管吸収を阻害することにより、ナドロールの血中移行を低下させることが明らかとなった。この結果、ナドロールの血中濃度は緑茶飲用時に著明に低下し、薬効が減弱したことが示唆される。

#### E. 結論

緑茶飲用により薬物トランスポーター OATP1A2 を介して薬物動態が変化し、薬物効果も影響される可能性が示された。薬物応答の民族差を考慮する場合、日本人での緑茶飲用は無視できない外的因子と考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Misaka S, Kawabe K, Onoue S, Werba JP, Giroli M, Watanabe H, Yamada S: Green tea extract affects cytochrome P450 3A activity and pharmacokinetics of simvastatin in rats. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 28(3):

244-249, 2013.

(2) Misaka S, Yatabe J, Muller F, Takano K, Kawabe K, Glaeser H, Yatabe MS, Onoue S, Werba JP, Watanabe H, Yamada S, Fromm MF, Kimura J: Green tea ingestion greatly reduces plasma concentrations of nadolol in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 95(4):432-438, doi: 10.1038/clpt.2013.241. 2014.

##### 2. 学会発表

(1) Watanabe H : Ethnic difference in drug response among Asians, The 12th Meeting of The Asia Pacific Federation of Pharmacologists, Shanghai (China) ,2013年7月12日.

#### H. 知的財産権の出願、登録状況

なし

東アジア民族のデータを用いる新薬開発戦略の構築

研究分担者 宇山佳明

（（独）医薬品医療機器総合機構 審査マネジメント部審査企画課長）

研究要旨：

わが国での国際共同治験の実施は、2007年度以降増加傾向にあり、その対象疾患は、がん、循環器系疾患、精神・神経疾患が多いが、近年ではそれ以外の疾患領域でも実施されている。また、国際共同治験の中でもアジア地域のみにおいて実施されるアジア国際共同治験も毎年一定程度実施されるようになり、日本における国際共同治験の実施が定着するとともに、その連携の様式も多様化しつつある。ドラッグ・ラグ、特に近年課題となっている開発ラグを短縮するために、国際共同共同治験の実施がどの程度有効であるのかを検討するため、近年承認された医薬品の開発戦略と開発ラグとの関係を調査した。その結果、国際共同治験を主な臨床試験成績として承認された医薬品の開発ラグは、他の国内開発やブリッジングにより開発した場合の開発ラグよりも有意に短く、国際共同治験の実施は、開発ラグの短縮に有効であることが明らかとなった。また、開発ラグの短縮に寄与するその他の要因としては、国内第Ⅱ相試験を米国での承認申請前に開始している場合、開発品目が日本の企業により発見され、その企業で臨床開発が実施されている場合などがあり、シーズ発見のための国内基礎研究能力の更なる向上や日本で早期に臨床開発を開始するための環境整備なども、開発ラグの短縮には重要であることが示された。なお、適切に評価するためには、国際共同治験に十分な日本人症例数を組み入れる必要があるが、アジア地域のみで国際共同治験を実施した場合には、より多くの日本人患者が組み入れられていた。したがって、個々の医薬品ごとに最善の開発戦略を検討する必要があるが、アジア地域における連携を強化しながら国際共同開発を進めることが、適切な評価を行いながらかつ開発ラグを最小限にするための戦略の一つとして有用であると考えられた。

以上より、日本における国際共同治験の実施はほぼ定着し、様々な開発戦略が考えられる中、国際共同治験の実施が、開発ラグそしてドラッグ・ラグの改善に有用であることが明らかとなった。承認審査時の留意点等もある程度整理されつつあるが、事例を集積してさらに検討していくことが必要と考えられる。今後は、アジア地域、特に東アジア地域におけるデータの集積を積極的に行うことを一つのオプションとし、医薬品の有効性および安全性に及ぼす民族的要因の影響に関して、科学的データをさらに集積して検討を進めることが、臨床開発の効率化と質の向上に貢献するとともに、東アジア地域で実施された国際共同治験の承認申請における利用を促進することにもつながるものと考えられる。

A. 研究目的：

1990年に設立されたICH (The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)での成果として、医薬品規制に関する国際的整合化が着実に進んでいるが、それとともに医薬品開発の国際化も近年進展してきている。1998年に合意されたICH E5 ガイドライン（外国臨床データを受け入れる際に考慮すべき民族的要因についての指針）の施行以降、日本での承認申請において、海外臨床データを利用するケースが増加しており、近年では、国際共同治験のデータが承認申請時の資料に含まれているケースも増加する傾向にある。ま

た、最近では日中韓における規制当局間の連携が進みつつあり、これら東アジア地域で実施された臨床試験データの適切な利用も検討課題となっている。

このような状況において、日本では、2007年に「国際共同治験に関する基本的考え方について」（通知）が（[http://www.pmda.go.jp/kijunsakusei/file/guideline/new\\_drug/kokusai\\_kyoudou\\_chiken.pdf](http://www.pmda.go.jp/kijunsakusei/file/guideline/new_drug/kokusai_kyoudou_chiken.pdf)）、2012年には「国際共同治験に関する基本的考え方（参考事例）」（事務連絡）が追加で公表されている（[http://www.pmda.go.jp/kijunsakusei/file/guideline/new\\_drug/GCT\\_jirei.pdf](http://www.pmda.go.jp/kijunsakusei/file/guideline/new_drug/GCT_jirei.pdf)）。

本研究では、医薬品の国際共同開発の現状を把



握し、海外データ、特に東アジア地域で実施された臨床試験データを適切に評価するための留意点、効率的な開発戦略等を検討することを目的とした。

## B. 研究方法：

本邦における医薬品承認審査情報や治験データ、国内外での承認申請関連情報等に基づき、現状の把握と課題を抽出し、今後の方策について考察を加えた。

(倫理面での配慮)

本研究は、直接ヒトを対象としたり、ヒトのサンプルを用いる研究ではなく、個人情報等を取り扱うものではない。

## C. 研究結果及び考察：

2007年に「国際共同治験に関する基本的考え方について」(通知)が公表されて以降、日本における国際共同治験は年々増加し、近年では全治験の約1/4が国際共同治験として実施されている。これに伴い、国際共同治験を主たる臨床試験成績として承認された医薬品の割合も近年増加している(図1)。一方、ブリッジングに基づく承認は、2002年には全体の25%を占めていたが(Uyama Y et al, Clin Pharmacol Ther, 78: 102-113, 2005)、近年では減少傾向にあり、ここ数年では全体の2%以内に留まっている。これは、近年では国際共同治験の実施が一般化し、海外で既に実施された臨床試験結果をブリッジングに基づき国内に外挿するという開発戦略よりも、国際共同治験に日本も参加し海外と同時に開発を進めるという開発戦略が増加したためと考えられる。

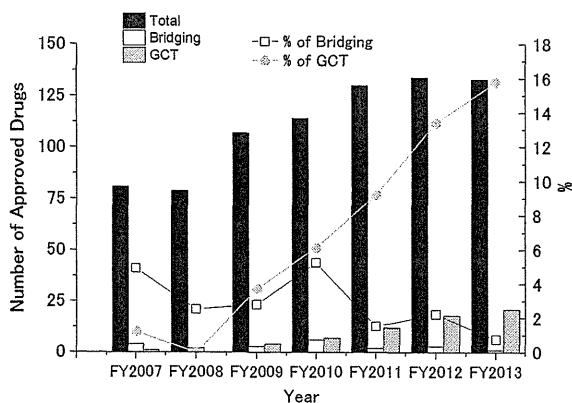


図1 日本の承認申請数と国際共同治験を主として承認された医薬品の割合

これら国際共同治験は、日米欧の他、他の東アジア地域、南米、オーストラリア、南アフリカ等の多地域にまたがって実施されている場合が多

かったが、日本を含むアジア地域のみで実施されている治験も近年では毎年数%程度を占めるようになっており、アジア地域における医薬品開発の重要性が高まっているものと考えられた。治験届における国際共同治験の実施割合を考慮すると、国際共同治験を主たる臨床試験成績とする承認申請が今後さらに増加するものと推測される。

昨年から引き続き承認された品目について審査報告書での記載内容を調査し、国際共同治験の結果を適切に評価する上での主な留意点を整理すると、以下のようなものであった。なお、承認可と判断された品目のみを対象としていることから、承認上の大きな問題は認められていないことを考慮する必要がある。

- 東アジアを国際共同治験の主な治験実施地域とする場合であっても、民族的要因の考察は重要である。
- 内因性民族的要因のみならず、併用薬等の外因性民族的要因が評価に影響を与える場合があるため、事前の検討が重要である。
- 母集団薬物動態解析結果は、民族的要因の有無を確認するために有用であり、治験での適切な用量範囲を決定するために重要な情報となりうる。
- 全集団での結果を評価し、そして全集団と日本人集団での結果の一貫性を確認することが評価において有用である。
- ある集団での症例数が極端に少ないと、民族間で大きな差異があった場合に、その要因等について結論づけることは困難となる。
- 有害事象等の安全性評価においては、データの収集方法が影響を与える場合があり、事前の検討が重要である。

国際共同治験の実施が一般的となる中、国際共同治験を主とする開発戦略が、日本における臨床開発戦略として、どの程度有効であるのかを検討するため、開発戦略がドラッグ・ラグに及ぼす影響を検討した。ドラッグ・ラグは、承認申請後の承認審査の遅延により生じる審査ラグと、承認申請時期が海外よりも遅延する開発ラグに分類されるが、審査ラグについては、近年の取り組みによって改善していると考えられることから

(<http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/file/201011kohyo.pdf>)、本研究では現状でも数年単位のラグが存在し、今後改善に向けた取り組みが必要と考えられる開発ラグに着目して検討を行った。

2007年度から2012年度までに日本で承認された新有効成分含有医薬品のうち、日本のみで承認されており米国での開発が確認できなかった品

目や米国での承認申請日が不明であった品目等を除き 183 品目を対象として、日米における承認申請時期と日本における臨床開発戦略との関係を検討した。その結果、対象品目の対象期間における日本の米国に対する開発ラグは 1111 日であった。これを開発戦略ごとに検討したところ、国内のみで臨床開発を行った場合に長い傾向がみられ（中央値：1870 日）、国際共同治験に基づき開発を進めた場合に開発ラグはもっとも短かった（中央値：90 日）（図 2）。

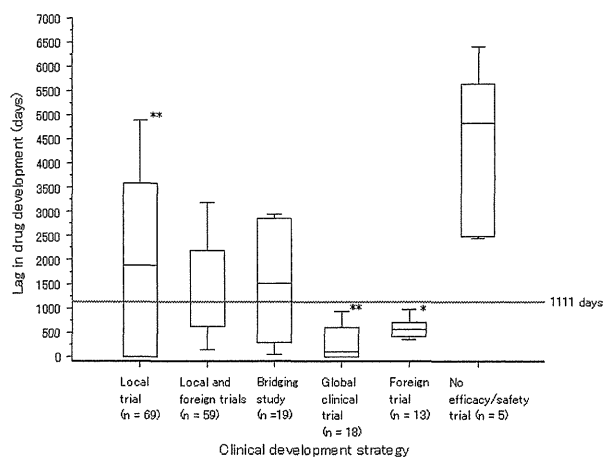


図 2 日本で承認された医薬品の開発戦略と開発ラグとの関係

また開発ラグは対象とする疾患分野によっても違いが認められ、ATC 分類の L（抗悪性腫瘍薬と免疫調節薬）で短く、N（神経系）で長い傾向があった。その他の要因として、開発ラグは、国内第 II 相試験を米国での承認申請前に開始している場合や開発品目が日本の企業により発見され、その企業で臨床開発が実施されている場合などに短縮されていた。したがって、国際共同治験の実施が開発ラグの短縮に有効であるとともに、開発のシーズを日本で発見するための国内基礎研究能力の更なる向上や日本で早期に臨床開発を開始するための環境整備なども、開発ラグの短縮には重要であると考えられた。

一方で、国際共同治験等の開発戦略を取った場合には、承認申請時まで集積される日本人データの割合が低下することが明らかとなっている

(Ichimaru K et al, *Clin Pharmacol Ther*, 87: 362-366, 2010) ことから、開発戦略と日本人症例数との関係を検討した。その結果、国内のみで臨床開発を実施した場合に比べ、海外臨床試験成績を利用した場合には、日本人症例数が低下していたが、国際共同治験の場合には、日本人症例数の割合は様々で、他の開発戦略に比べ多様であることが明らかとなった。その内訳について検討す

ると、国際共同治験の中でもアジア地域のみで実施された国際共同治験の場合に、日本人症例数の割合が他の場合よりも高い（中央値：41%）ことが明らかとなり、アジア地域で国際共同治験を実施した場合には、比較的多くの日本人症例数を組み入れることが可能と考えられた。

以上より、日本における国際共同治験の実施はほぼ定着し、様々な開発戦略が考えられる中、国際共同治験の実施が、開発ラグそしてドラッグ・ラグの改善に有用であることが明らかとなった。承認審査時の留意点等もある程度整理されつつあるが、事例を集積してさらに検討が必要と考えられた。今後は、アジア地域、特に東アジア地域におけるデータの集積を積極的に行うことを一つのオプションとし、医薬品の有効性および安全性に及ぼす民族的要因の影響に関して、科学的データをさらに集積して検討を進めることが、臨床開発の効率化と質の向上に貢献するとともに、東アジア地域で実施された国際共同治験の承認申請における利用を促進することにもつながるものと考えられる。

#### D. 健康危険情報：

該当なし

#### E. 研究発表：

論文発表

- Asano, K., Tanaka, A., Sato, T. & Uyama, Y. Regulatory Challenges in the Review of Data from Global Clinical Trials: The PMDA Perspective. *Clin Pharmacol Ther* 94, 195-8 (2013).
- Ishiguro, A., Yagi, S. & Uyama, Y. Characteristics of pharmacogenomics/biomarker-guided clinical trials for regulatory approval of anti-cancer drugs in Japan. *J Hum Genet* 58, 313-6 (2013).
- Ueno, T., Asahina, Y., Tanaka, A., Yamada, H., Nakamura, M. & Uyama, Y. Significant differences in drug-lag in clinical development among various strategies used for regulatory submissions in Japan. *Clin Pharmacol Ther* 95, 533-41 (2014).

学会発表

- Uyama Y, PMDA's perspective in global clinical data evaluation for drug approval, 7th Annual conference in Japan for Asian new drug development, Tokyo (2013.4.15)
- Uyama Y, Regulatory science research in PMDA, 12th Kitasato University-Harvard School of Public Health Symposium-Advanced and Global

Drug Development: Next steps and actions as one of the leading countries, Tokyo (2013.5.14)

3. Uyama Y, Regulatory use of innovative tools in drug development, Pharmaceutical & Regulatory Science workshop,-Revitalizing clinical trial methodology and translational statistics, Boston, USA (2013.5.23)
4. 宇山佳明, 日本の医薬品開発における課題とレギュラトリーサイエンスの役割ー向精神薬を例にしてー, 第 23 回日本臨床精神神経薬理学会・第 43 回日本神経精神薬理学会 合同年会, 沖縄 (2013.10.26)
5. Uyama Y, Expectation for the ARO-Regulatory Perspective-, 10th Annual meeting DIA Japan 2013, Tokyo (2013.11.7)
6. Uyama Y, PMDA's experiences to review data of bridging study based on ICH E5 guideline, FIP SIG Regulatory Science Workshop, "Harmonization of Bridging Studies among Asia-Pacific Region, Taipei, Taiwan (2013.11.27)
7. Uyama Y, New trend of clinical development in Japan; from sequential bridging to simultaneous global development, FIP SIG Regulatory Science Workshop, "Harmonization of Bridging Studies among Asia-Pacific Region, Taipei, Taiwan (2013.11.27)
8. 宇山佳明, 東アジア圏の民族差についての規制当局の考え方, 第 34 回日本臨床薬理学会 学術総会, 招待講演, 東京 (2013.12.5)

F. 知的財産権の出願・登録状況:

該当なし

G. 添付資料

該当なし

薬物動態における民族差が生じる要因に関する研究

研究分担者 斎藤 嘉朗 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 部長  
研究協力者 佐井 君江 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 室長  
研究協力者 杉山 永見子 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 非常勤職員

研究要旨：

民族差要因として重要な機能変化を有する薬物動態関連の 6 遺伝子 12 多型について、東アジア諸民族と日本人との多型頻度差を文献調査し、ヨーロッパにおける地域差と比較した。特に *CYP2A6*\*4 は、2 倍以上の頻度差が日中間で認められたことから、注意すべきと考えられた。またフェニトインのタンパク質アダクト形成に關与する *CYP2C19* において、活性消失型多型はアダクト形成を低下させることが示唆され、副作用発現における人種差の一因となっている可能性が考えられた。

A. 研究目的：

ドラッグラグの解消のため、本邦を含めた各国同時開発・承認に向けた国際共同治験の推進が重要とされており、さらに近年は、日本人と民族的に類似しているとされる東アジア共同治験の事例が増加している。しかし、その推進において問題となり得る民族差が、東アジアの中で、薬物動態および薬力学（有効性・安全性）において存在するか否かは、十分評価されていない。

ICH E5 ガイドラインによれば、民族差は内因性要因と外因性要因に分類されるが、内因性要因として重要な因子に、ゲノム上の塩基置換や挿入・欠失等の遺伝子多型がある。本研究は、主として東アジア（日中韓）における主要薬物動態・薬力学関連遺伝子の、機能変化をもたらす比較のエビデンスレベルの高い多型に関し、そのアレル頻度を比較して、民族差の有無を明らかにすることを目的とした。

また薬物代謝酵素による反応性代謝物の生成は、酸化ストレスの増大・タンパク質への結合に基づく機能変化による細胞障害、また新規抗原の創生によるアレルギー性副作用の発現につながる可能性が指摘されている。しかし、このような観点から民族差を解析した報告はない。そこで副作用発現につながる薬物動態学的な民族差の要因解明（特に遺伝子多型影響の解明）のため、昨年度構築したヒト肝由来試料を用いた *in vitro* 評価系により、フェニトインをモデル化合物として、タンパク質への共有結合性における遺伝子多型の影響を検討した。

B. 研究方法：

（1）主要薬物動態関連遺伝子の機能多型におけるアレル頻度の民族差解析

主として文献調査により下記の機能変化をもたらす遺伝子多型、薬剤による副作用の発症と関連するハプロタイプに関して、東アジア各国におけるマイナーアレル頻度（MAF）の比較を行った。

1. *CYP2A6*\*4
2. *CYP2B6*\*4, \*5, \*6
3. *FMO3* 472G>A (E158K) および 923A>G (E308G)
4. *ABCB1* 1236C>T (G412G), 2677G>T (A893S), 2677G>A (A893T), 3435C>T (I1145I)
5. *ABCB11* 1331T>C (V444A)
6. *SLC22A2* 808G>T (A270S)

使用するデータは、健常人を主体としたが、健常人データが非常に限られている *CYP2B6* 等に関しては、病院コントロール（複数の疾患群を含む集団）、ならびに HIV 感染者や風土病症例（対象遺伝子多型との関連が無いとされる疾患集団）のデータも合算することとした。なお、単一疾患の集団や、喫煙者または非喫煙者のみの集団（*CYP2A6* の場合）については除外した。同一民族で複数報ある場合には合算してアレル頻度を算出したが、同一国内でも、民族が明らかに異なる場合（例：中国におけるウイグル族や内モンゴル族）は別々に集計を行った。日本人において、アレル頻度 0.1 以上の遺伝子多型については 0.1 以上の差を、0.1 未満の場合は 0.05 以上の差に注目した。また比較対照として、白人に関するヨーロッパにおける地域（東・西・南・北）差も併せて解析した。

なお、地域の分類は、国連における分類法