

サンドイッチ培養肝細胞を用いた薬物の輸送及び代謝のモデル解析

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-05
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者:
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/42242

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



氏 名	松永 憲和
学 位 の 種 類	博士（創薬科学）
学 位 記 番 号	甲第13号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 23 日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第4条第1項）
学位授与の題目	サンドイッチ培養肝細胞を用いた薬物の輸送及び代謝のモデル解析
論文審査委員	主査 玉井 郁巳 副査 加藤 将夫 副査 中島 美紀 副査 檜井 栄一 副査 中西 猛夫

学位論文要旨

Abstract

Sandwich-cultured hepatocytes (SCHs) are unique *in vitro* system because of retaining *in vivo*-like properties including domestic enzyme activities and the entire array of transporter proteins; therefore, we investigated the utility of human SCHs in a mathematical modeling approach to evaluate the disposition of drugs that undergo hepatic metabolism. *In vivo* metabolite profile of paroxetine, in which multiple drug-metabolizing enzymes are involved, was predicated by use of rat and human SCHs. When mycophenolic acid (MPA) was incubated with human SCHs, formed phenyl-glucuronide (MPAG) was effluxed into the buffer (basolateral side) via MRP3 and MRP4 as well as into the bile canalicular lumen via MRP2. A mathematical modeling of hepatic disposition of MPA and MPAG in human SCHs showed that basolateral efflux is a rate-limiting process of formed MPAG and that cyclosporin A (CsA) inhibits both basolateral uptake and biliary excretion of MPAG at clinically relevant concentrations, resulting in the changes in systemic exposure of MPA and MPAG in humans. Finally, based on a quantitative modeling established from experimental analyses in human SCHs, a novel metabolic pathway of bosentan was discovered by determining an unreported metabolite (M4). Besides, a ratio of first-order rate constant of basolateral efflux to bile canalicular efflux transport ($k_{\text{efflux}}/k_{\text{bile}}$) is shown to be a marker for systemic exposure of formed metabolites of drugs in the liver from the results of MPAG and bosentan's metabolites. These studies demonstrated a usefulness of SCHs as a tool to understand and predict hepatic disposition of drugs, including metabolism and transport.

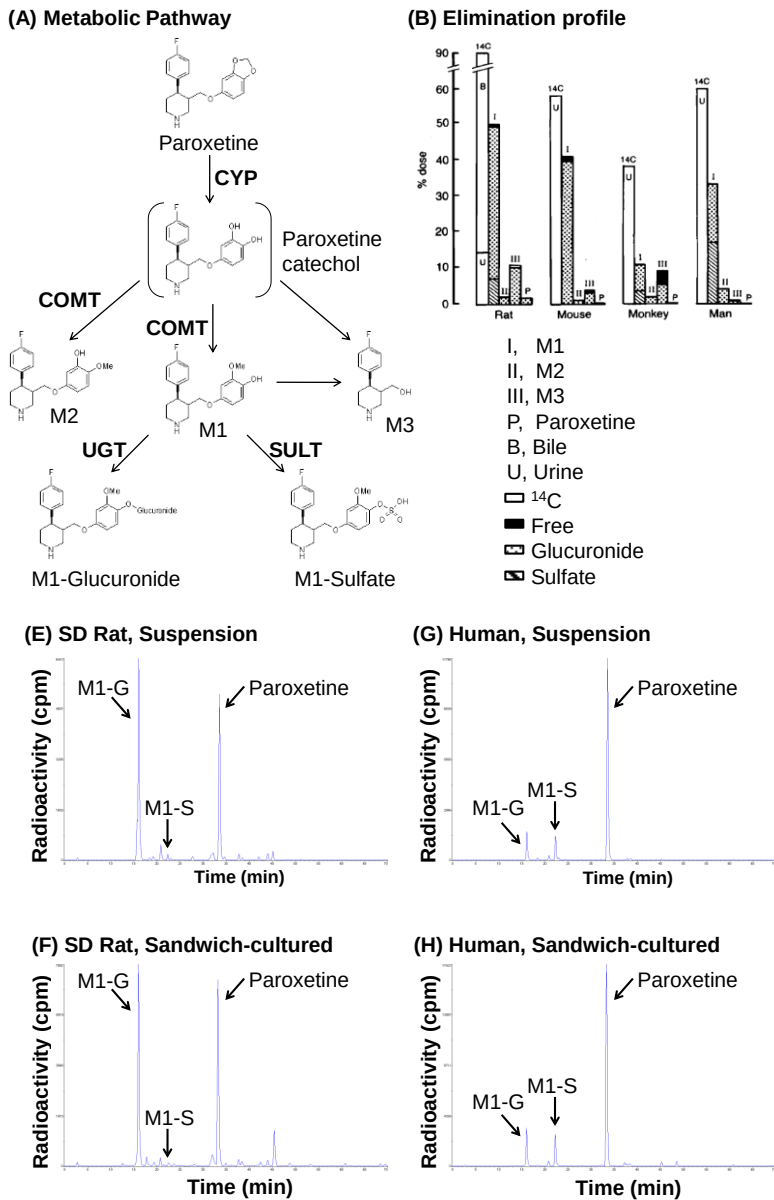
要 旨

日本、米国及び欧州の規制当局から近年相次いで発行された医薬品開発における代謝物の安全性及び薬物間相互作用評価に関するガイダンス/ガイドラインによって、代謝物研究はより定量的な予測が必要とされるようになった。このため、薬物代謝の主要臓器である肝臓中での薬物動態の定量的な予測手法が求められるに至っている。薬物の肝動態を評価する *in vitro* 試験系の中で、サンドイッチ培養肝細胞 (SCHs) は薬物代謝酵素活性を維持しているとともに、細胞同士の *tight-junction* によって毛細胆管腔を形成し、*canalicular network system* を構築できる。このため、SCHs は培養液 (血管側)、肝細胞、並びに毛細胆管腔の三つのコンパートメント間での薬物代謝や輸送を評価できる特徴的な *in vitro* 肝動態評価手法である。また、近年では医薬品開発にも *model-based drug development* (MBDD) の重要性が謳われ、*systems biology* や *systems pharmacology* といった速度論に基づくモデリング&シミュレーション (M&S) の利用が活発化している。そこで、本研究では肝代謝が薬物動態上重要な医薬品に着目し、SCHs での代謝物を含む薬物の肝動態を検討し、得られた結果を数理モデルに基づいて解析することで、代謝物の *in vivo* 動態予測への応用性を検討した。

ラットとヒトの間に輸送と代謝の種差が存在する paroxetine をモデル薬物として、SCHs での ^3H -paroxetine の代謝物組成を評価した。複数の代謝酵素 (CYP, COMT, UGT 及び SULT) が関与する paroxetine の *in vitro* 代謝物組成は、SCHs と浮遊肝細胞間で差はなく、且つ *in*

vivo を反映したものであった (Fig. 1). 更に, paroxetine の主代謝物 M1-G (M1 のグルクロン酸抱合体) はヒト, ラットともに胆管側膜上のトランスポーターMRP2/Mrp2 の基質であることを明らかにし, ラットとヒトにおける M1-G の胆汁中排泄の種差は, MRP2/Mrp2 の種差が関係していると考えられた. 一方, SCHs を用いた胆汁中排泄過程に関する既存の評価方法 (蓄積量, BEI 評価) では, 肝細胞内から体循環へ移行する過程を十分評価又は予測出来なかった.

Fig. 1 Metabolic pathway, metabolite profile, and excretion fate of paroxetine



(A) Metabolic pathway of paroxetine with minor modifications of three articles cited from Haddock RE et al. (Acta Psychiatr Scand Suppl. 1989;350:24-6), Kaye CM et al. (Acta Psychiatr Scand Suppl. 1989;350:60-75), and Jornil J et al. (Drug Metab Dispos. 2010;38(3):376-85).

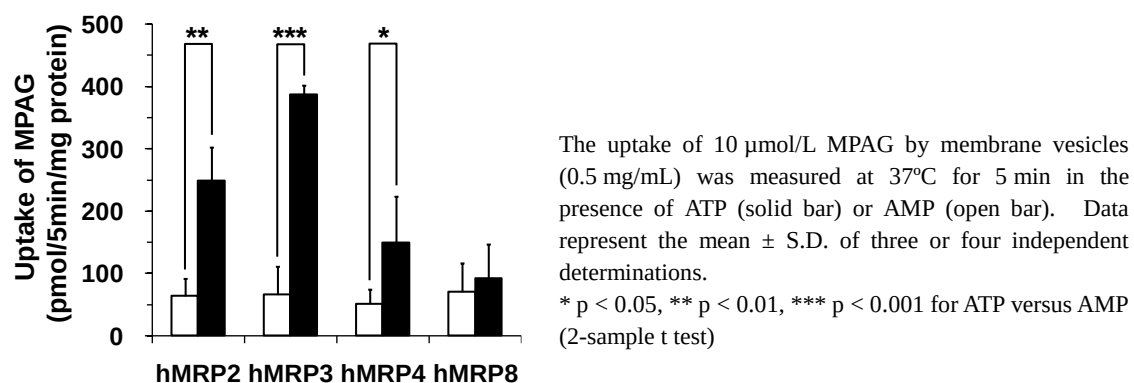
(B) *In vivo* metabolite profiles and excretion fate after single administration of [¹⁴C]paroxetine to rats, mice, monkeys, and humans, respectively, with minor modification of the article cited from Haddock RE et al. (Acta Psychiatr Scand Suppl. 1989;350:24-6).

(E) and (F) Typical radiochromatograms of [³H]paroxetine after incubation with suspended rat hepatocytes and rat SCHs, respectively.

(G) and (H) Typical radiochromatograms of [³H]paroxetine after incubation with suspended human hepatocytes and human SCHs, respectively.

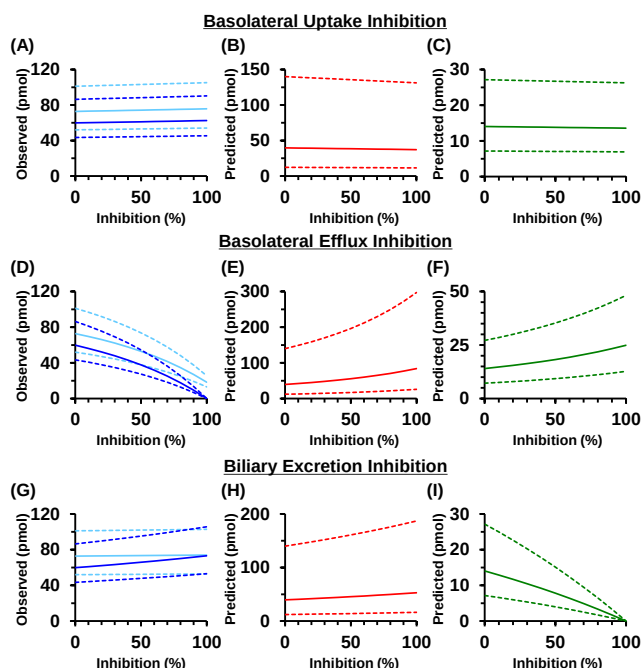
Mycophenolic acid (MPA) の主代謝物であるフェノール型グルクロン酸抱合体 (MPAG) は胆汁中に排泄され、その腸肝循環が MPA の血漿中トラフ濃度の維持に寄与すると考えられている。一方、MPAG のヒト血漿中での曝露量は未変化体の約 4 倍であり、投与された MPA の 90% 以上は最終的に MPAG として尿中に排泄される。つまり、肝細胞内で生成した MPAG は胆管側膜を介して胆汁中に排泄されるとともに、血管側膜を介して体循環にも多く移行する代謝物と考えられる。このため、ヒト SCHs 中での MPA 及び MPAG の肝動態を検討したところ、MPAG は胆管側膜上のトランスポーターの良好な基質であったが、肝細胞内で生成した MPAG は血管側膜を介して外部メディウム（バッファー）中にも多く排出されていた。そこで、ヒト MRP を過剰に発現させた膜ベシクルを用いて基質認識性及び酵素キネティクスの検討を行った。その結果、MPAG はヒト MRP2、MRP3 及び MRP4 の基質となり (Fig. 2)、胆管側膜を介した胆汁中排泄には主に MRP2 が、血管側膜を介した体循環への移行には主に MRP3 及び MRP4 が関与していると考えられた。

Fig.2 Uptake of MPAG by membrane vesicles expressing human MRPs



更に、ヒト SCHs 中での MPA 及び MPAG の肝動態をモデル化し、肝動態の変動をシミュレーションした結果、ヒト肝細胞中で生成した MPAG の肝動態の律速過程は血管側膜を介した basolateral efflux 過程であると考えられた (Fig. 3)。

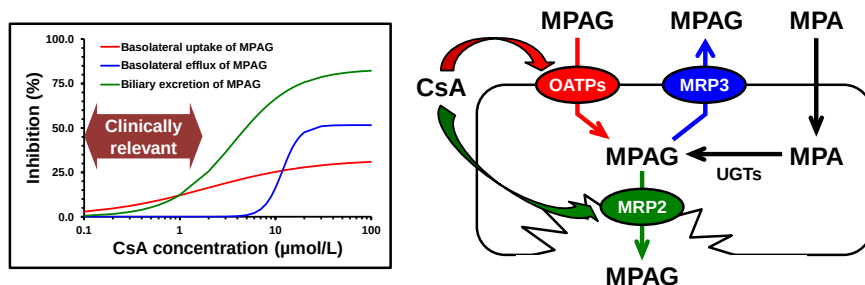
Fig.3 Simulations of inhibitory effects on formed MPAG disposition in human SCHs



The predicted changes in the amount of MPAG in the buffer (A, D, and G), hepatocytes (B, E, and H), and bile canaliculi (C, F, and I) are indicated. The simulations were performed using the final population pharmacokinetic model incorporating the flow from the bile canaliculi to the buffer. The 5th and 95th percentiles (upper and lower dashed line) and the median (middle solid line) obtained from 1000 simulated independent experiments are shown. The blue line indicates the efflux-mediated MPAG profile. The light blue line indicates the whole MPAG profile in the buffer. The red and green lines indicate the MPAG profiles in the hepatocytes and bile canaliculi, respectively.

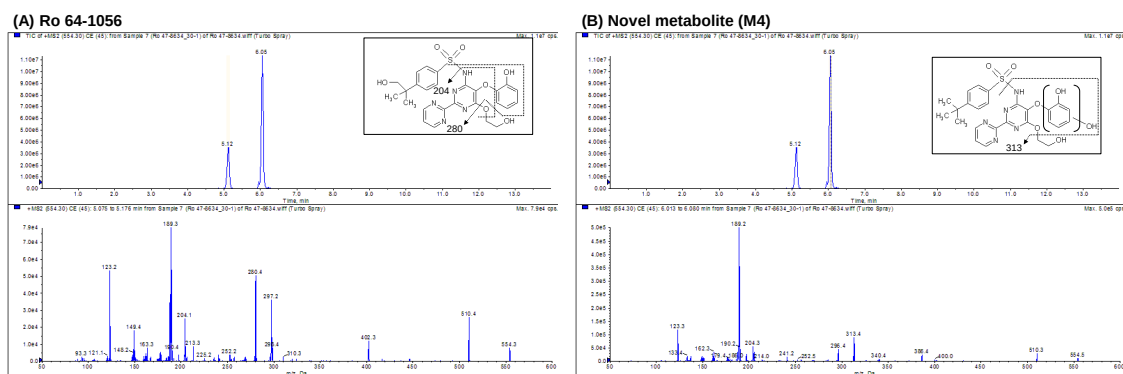
MPA はカルシニューリン阻害薬とは異なる作用点を有する免疫抑制薬であり、臨床ではカルシニューリン阻害薬としばしば併用される。移植患者にカルシニューリン阻害薬である cyclosporin A (CsA) と MPA を併用したときの血漿中 MPA のトラフ濃度は、CsA 非併用群と比較して有意に低下することが報告されている。このため、ヒト SCHs における MPA 及び MPAG の肝動態に対する CsA の影響を検討するとともに、既に構築した MPA 及び MPAG の肝動態モデルを用いて CsA が影響する過程について検討した。その結果、CsA は MPA の輸送及び細胞内代謝過程に影響しなかったが、MPAG の basolateral uptake, basolateral efflux 及び biliary excretion の各過程を阻害した。得られた CsA の阻害パラメータから、CsA の臨床的な濃度を考慮した阻害シミュレーションを行ったところ、CsA は MPAG の肝動態の律速過程である basolateral efflux は阻害せず、basolateral uptake 及び biliary excretion 過程を阻害することで MPAG の腸肝循環が抑制され、再吸収される MPA 量が低下するために MPA の血漿中トラフ濃度が低下すると考えられた (Fig. 4)。

Fig. 4 Drug-drug interaction between MPA and CsA at clinically relevant concentrations



Bosentan は肺性高血圧症治療薬として使用されている非選択的エンドセリン受容体拮抗薬であり、その代謝には **CYP2C9** 及び **CYP3A** が関与している。放射性標識体を用いたヒトのマスバランス試験では、単回静脈内投与後の尿中及び糞中に未変化体 (**bosentan**) として排泄された量は投与量の 5% 未満、また尿中へ排泄された放射能量も投与量の 5% 程度であった。このことは、**bosentan** は肝代謝によって消失し、肝臓内で生成した代謝物は体循環にあまり移行せず、胆汁を介して糞中へ排泄されることを示している。そこで、ヒト **SCHs** を用いて **bosentan** 及びその代謝物の肝動態のモデリングを試みたところ、既報の **bosentan** の代謝経路では試験系内の物質収支 (肝細胞中 **Ro 64-1056**) を過大に予測する結果が得られた。このため、ヒト肝ミクロソームを用いた新規代謝経路の検討を行ったところ、**Ro 47-8634** の **CYP** を介した代謝過程に **Ro 64-1056** 以外の代謝物経路が存在することを明らかにし、詳細な検討により新規代謝物 (**M4**) の構造を推定するに至った (Fig. 5)。

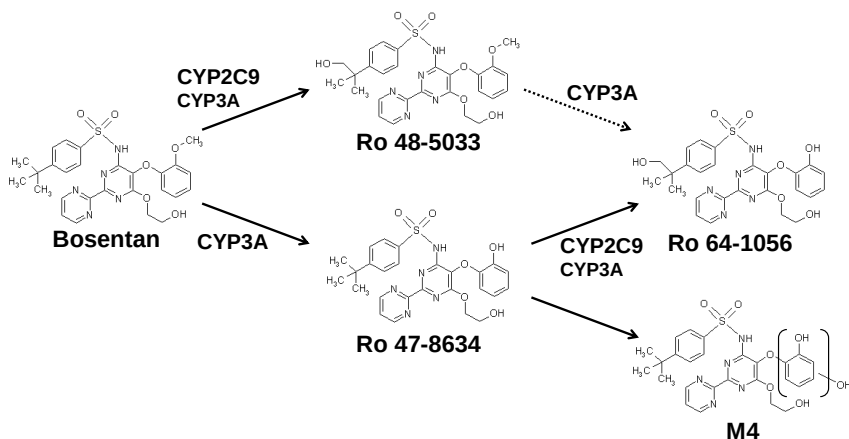
Fig. 5 MS/MS fragmentations by product ion scan



(A) and (B) MS/MS fragmentation patterns of **Ro 64-1056** and a novel metabolite (**M4**), respectively.

更に、新規代謝経路 (Fig. 6) を組み込んだ肝動態モデルでは、ヒト **SCHs** における **bosentan** 及び代謝物 (**Ro 48-5033**, **Ro 47-8634** 及び **Ro 64-1056**) の量的推移を良好に予測することが出来た。

Fig. 6 Proposed metabolic pathway of **bosentan** in humans



最後に、MPA 及び bosentan のサンドイッチ培養ヒト肝細胞中での肝動態モデリングによって得られた代謝物の basolateral efflux と biliary excretion 輸送の一次速度定数比 ($k_{\text{efflux}}/k_{\text{bile}}$) について検討したところ、体循環に移行しやすい代謝物 MPAG の $k_{\text{efflux}}/k_{\text{bile}}$ は、体循環に移行しにくい代謝物 (Ro 48-5033, Ro 47-8634 及び Ro 64-1056) の $k_{\text{efflux}}/k_{\text{bile}}$ よりも大きかった (Table 1). したがって、SCHs における輸送及び代謝をモデル解析し、代謝物の輸送一次速度定数比 $k_{\text{efflux}}/k_{\text{bile}}$ を指標にすることで、代謝物の体循環への移行を考察できることが示唆された.

Table 1 Ratio of first-order rate constants for transport of formed metabolites ($k_{\text{efflux}}/k_{\text{bile}}$) in human SCHs

Metabolite	$k_{\text{efflux}}/k_{\text{bile}}$
MPAG	2.420
Ro 48-5033	0.755
Ro 47-8634	1.317
Ro 64-1056	0.785

以上、本研究では SCHs を用いた輸送と代謝の同時評価の有用性を検討するとともに、得られた結果を数学的なモデルで解析することで、より定量的な肝動態予測へと展開することに成功した. また、モデル解析によって新たな代謝経路が示唆できることで、新規代謝物の発見への展開も可能であることを示すことが出来た. 更に、肝動態モデリングによって得られる代謝物の輸送一次速度定数比 $k_{\text{efflux}}/k_{\text{bile}}$ が、体循環への移行を予測する指標になり得ることを示唆できた. 今後、更に複数の薬物を用いた検討によって、その妥当性が確かめられること、及び医薬品開発への応用が期待される.

審査結果の要旨

本研究は、薬効および毒性に大きく影響する医薬品の肝動態を評価する試験系として、他の *in vitro* 評価系と比べて薬物代謝酵素やトランスポーターの発現が維持されているサンドイッチ培養肝細胞 (Sandwich-cultured hepatocyte: SCH) に着目し、本実験系で得られた肝動態をモデル化により定量的に解析することによって、*in vivo* 動態予測へと展開することの有用性を評価したものである。具体的には、paroxetine 動態の種差、mycophenolic acid (MPA) 及びその抱合代謝物 (MPAG) の肝動態と cyclosporin A (CsA) との相互作用の評価、並びに bosentan 及びその代謝物の肝動態解析を行った。その結果、複数の代謝酵素 (CYP, COMT, UGT 及び SULT) が関与する paroxetine の *in vitro* 代謝物組成は *in vivo* を反映したものであり、主代謝物であるグルクロン酸抱合体の胆汁中排泄に関わる MRP2 輸送体が薬物動態的な種差の原因であることを見出した。MPA の肝動態に関する SCH を用いたモデル解析によって、CsA が MPA 動態に及ぼす相互作用は MPAG の腸肝循環に関与するトランスポーター活性変動に起因することを明らかにした。さらに、bosentan の肝動態のモデル解析は既存の代謝物のみでは不十分であることに着眼して研究を進めた結果、新しい代謝経路ならびに新規代謝物の同定に成功するに至った。以上、肝動態が複雑な医薬品をモデルとした複数の解析例を示すことによって、SCH を基盤とする薬物の肝動態モデリング解析が薬物動態予測に有用であることを示した。以上の成果は医薬品開発における薬物動態予測に貢献するものであることから、博士(創薬科学)に値すると判定された。