

# 複数臓器が関わる薬物動態のmicrophysiological systemを用いた予測と障害モデル動物を用いた解析

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-11-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 河西, 巧, KAWANISHI, Takumi メールアドレス: 所属: 金沢大学, 金沢大学, 金沢大学
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/00068055">http://hdl.handle.net/2297/00068055</a>

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



# 学位論文要旨

## Abstract

The aim of present study is to clarify change in pharmacokinetics involving multiple organs using liver disorder animal model and to predict such pharmacokinetics using a microphysiological system (MPS). Bile duct ligation (BDL) in mice resulted in reduction in intestinal permeability of imatinib compared with sham-operated mice, accompanied with reduction in the maximum plasma concentration after an oral administration of imatinib. Gene expression of *Bcrp* in small intestine in BDL mice was higher than sham-operated ones, suggesting that reduction of intestinal absorption of imatinib was caused by upregulation of intestinal *bcrp* expression. Moreover, the present study found that imatinib exposure to the kidney of BDL mice was 16-times higher than sham-operated mice. Reduction in renal efflux transport of imatinib in BDL mice, possibly due to decreased expression of *Mrp6* may be involved in its increased renal distribution. Concentration-time profiles of triazolam and its metabolites were analyzed in pressure driven entero-hepatic MPS to obtain kinetic parameters by model-dependent and independent analyses, revealing an increased glucuronidation clearance of triazolam in the two-organ MPS compared to that in the HepaRG single culture. Based on combination of such kinetic analyses and mathematical modeling, quantitative extrapolation of plasma concentration profiles of triazolam and its metabolites in humans were found to be successful.

## 要旨

【序論】薬物動態や毒性発現は単一の臓器・細胞種のみではなく、複数の臓器・細胞種の相互作用による制御を受けると考えられる。しかし、その実態はほとんど明らかとされていない。特にある特定の臓器に障害が起きた際に、他の臓器が代償機構として機能変化する可能性がある。また、現在の薬物動態の予測においては、臓器間相互作用は考慮されない。実際の臓器間相互作用を臓器間相互作用の観測とその分子機序の解明により、予測精度の高い薬物動態評価が期待される。本研究では臓器間相互作用の観測と解明を目的に、胆汁うっ滞モデルマウスを使用し、体内動態の変化および肝臓以外の小腸や腎臓における薬物動態因子の変化について調べた。また腸肝搭載 microphysiological system (MPS)を用い薬物代謝を評価するため、メカニズム依存的な薬物動態数理モデルの開発し、腸肝共培養における薬物解析を行なった。

【本論】①胆汁うっ滞に伴う imatinib の消化管吸収低下と薬物動態因子の変化  
雄性 ICR マウスの胆管を手術糸で結紮し、2 週間飼育することで胆管結紮(BDL)マウスを製作した。対照群(sham)および BDL マウス小腸において in situ loop 法で種々薬物の膜透過を調べ、sham と比べて膜透過が減少した imatinib を見出した。以降は imatinib を対象とした。

BDL マウスに imatinib を経口投与したところ、sham と比較し、imatinib の最高血漿中濃度が低値を示した(図 1)。一方、静脈内投与では血漿中濃度に大きな差はなかった。このため、胆汁うっ滞時において imatinib の消化管吸収の低下が示唆された。小腸 in situ loop 法で評価した imatinib の消化管膜透過性は、sham に比べ BDL マウスにおいて低値を示した。そのため、BDL マウスにおける吸収低下は、imatinib の小腸膜透過の低下により引き起こされていることが示唆された。このメカニズムを調べるため、小腸に発現する動態関連因子の mRNA 発現量を比較した。その結果、sham と比較し BDL マウスにおいては、薬物排出膜輸送体 bcrp の mRNA 発現量が高く、さらにマウス小腸刷子縁膜においても bcrp タンパク質の発現量が BDL において高かった(図 2)。BCRP は imatinib の主要な排出膜輸送体であることから、胆汁うっ滞による bcrp の発現上昇が imatinib の消化管吸収低下の要因と考えられた。さらに、bcrp の発現誘導メカニズムを追求するため、sham および BDL マウスの小腸において、主要な転写制御因子のターゲット遺伝子の発現量変化を調べた。その結果、AhR のターゲット遺伝子である

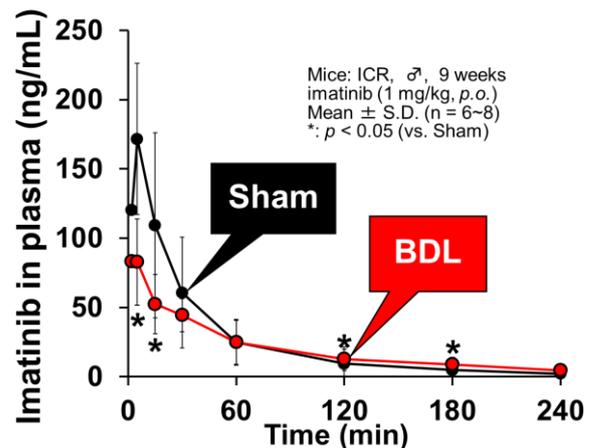


図1 BDLおよびShamマウスにおけるイマチニブ経口投与後の血漿中濃度推移

cyp1a1 の mRNA 発現量が増加したことから、AhR の活性化が bcrp 発現上昇メカニズムの原因と考えられた。ヒトにおいても胆汁うっ滞により BCRP の発現誘導が引き起こされるかを調べるため、Caco-2 細胞を用いて BCRP の誘導試験を行った。その結果、AhR アゴニストである omeprazole を添加したところ、CYP1A1 および BCRP の発現が上昇した。さらに BDL マウスから採取した血漿および糞抽出物を Caco-2 細胞に曝露したところ、血漿の曝露により CYP1A1 の発現が上昇し、AhR の活性化が示唆された。以上のことから、BDL マウスにおいて小腸の AhR 活性化を介して bcrp が誘導され、imatinib など BCRP 基質の薬物吸収が低下することが示唆された。肝臓の薬物消失臓器としての機能の低下を小腸が BCRP を誘導させることによって補っているものと推察された。

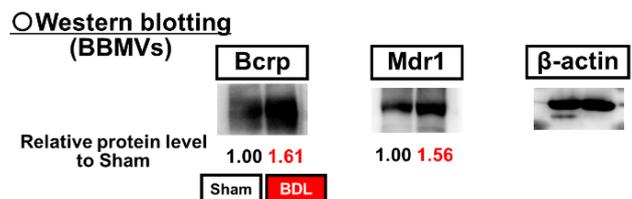
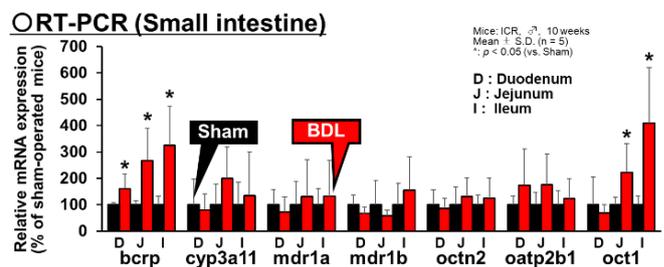


図2 BDLマウスにおける小腸膜輸送体と代謝酵素の発現量の変化

その結果、AhR のターゲット遺伝子である cyp1a1 の mRNA 発現量が増加したことから、AhR の活性化が bcrp 発現上昇メカニズムの原因と考えられた。ヒトにおいても胆汁うっ滞により BCRP の発現誘導が引き起こされるかを調べるため、Caco-2 細胞を用いて BCRP の誘導試験を行った。その結果、AhR アゴニストである omeprazole を添加したところ、CYP1A1 および BCRP の発現が上昇した。さらに BDL マウスから採取した血漿および糞抽出物を Caco-2 細胞に曝露したところ、血漿の曝露により CYP1A1 の発現が上昇し、AhR の活性化が示唆された。以上のことから、BDL マウスにおいて小腸の AhR 活性化を介して bcrp が誘導され、imatinib など BCRP 基質の薬物吸収が低下することが示唆された。肝臓の薬物消失臓器としての機能の低下を小腸が BCRP を誘導させることによって補っているものと推察された。

②胆汁うっ滞に伴う腎臓への imatinib 蓄積と薬物動態因子の変化

imatinib 静脈内投与後の腎臓への分布を評価したところ、imatinib の組織血漿中濃度比 (Kp 値) は、sham に比べ BDL マウスにおいて 16 倍高い値を示した(図 3)。BDL による imatinib の腎蓄積が細胞膜取り込みの変化により生じているかを調べるため、integration plot による腎臓への imatinib 取り込みを評価した。その結果、BDL マウスにおける imatinib の腎への取り込みクリアランスは sham と比較し 2.5 倍上昇した。血管側の膜輸送体を評価するため、それぞれのマウスから腎組織スライスを作製し取り込みと排出過程の変化を調べたところ、sham と

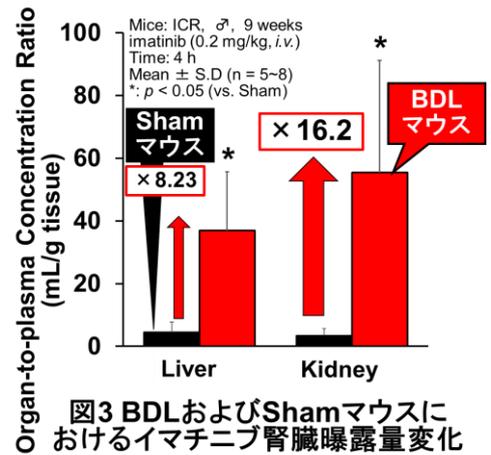


図3 BDLおよびShamマウスにおけるイマチニブ腎臓曝露量変化

比較し BDL マウスにおいて取り込み初速度は若干増加し、スライスからの排出速度は顕著に低下した(図 4)。このため、imatinib の血管側からの排出の低下が腎蓄積の主要な原因であることが示唆された。この分子メカニズムを調べるため、定量 PCR で遺伝子発現量を調べたが、候補となりうる膜輸送体は見いだせなかった。そこでタンパクレベルでの発現量を調べるため、本学学際科学実験センターとの共同研究により腎臓膜画分の網羅的プロテオミクス解析を行った。その結果、BDL マウス腎臓において排出膜輸送体 mrp6 のタンパク質発現量が顕著に低下していた。Western blotting による検討により、mrp6 の発現低下が裏付けられ、BDL マウスにおける imatinib の腎蓄積の原因である可能性が示された。さらに、mrp6 遺伝子導入細胞を作製し膜小胞での imatinib の輸送を調べた結果、imatinib が mrp6 の基質となることが明らかとなった。以上より、胆汁うっ滞時には、腎臓における mrp6 の発現量が低下し、imatinib の分布が増大することが示唆された。この結果は、肝障害時に低下した薬物消失能の腎臓による代償反応と考えれば説明できる一方、肝障害患者において血中濃度には反映されない腎への薬物蓄積を示唆しており、肝障害時に腎障害が多発する原因となっている可能性がある。

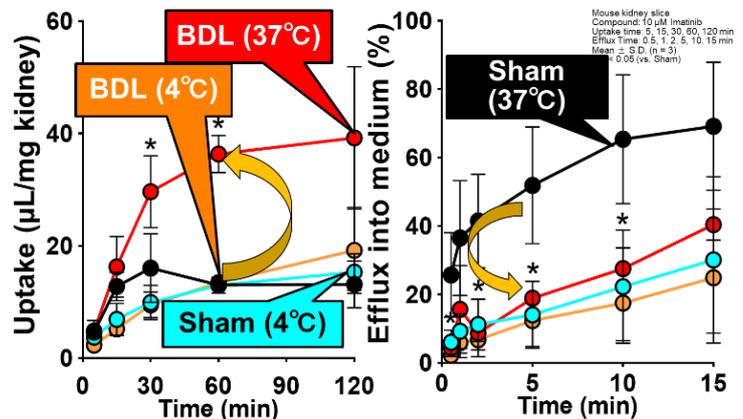


図4 BDLとshamマウスの腎組織スライスにおけるイマチニブの取り込みと流出

### ③肝-小腸連結 MPS モデルにおける共培養効果

Microphysiological system (MPS)を用い、HepaRG 細胞と Caco-2 細胞の共培養時の triazolam 実験を行った。Apical 側の triazolam は時間の経過とともに減少し、一方 systemic 側は定常状態の 3 µM に達するまで時間依存的に増加し、triazolam が Caco-2 細胞膜を透過したことが示唆された。また、systemic 側の α-OH triazolam および 4-OH triazolam の濃度も 48 時間まで増加した(Fig. 3C and 3D)。これらの代謝物は CYP3A 阻害剤 itraconazole 存在下では完全に産生されなかつ。同様な代謝実験を Caco-2 および HepaRG 単独培養でも行った。Caco-2 細胞

単独培養では、共培養と同じく triazolam の膜透過がみられたが、 $\alpha$ -OH triazolam および 4-OH triazolam は LC-MS/MS で検出されなかった。 $\alpha$ -OH triazolam および 4-OH triazolam、またグルクロン酸抱合生成のクリアランスは、モデルによらない解析方法とモデルによる解析を行った。共培養時の  $\alpha$ -OH triazolam および 4-OH triazolam を生成する代謝クリアランスは、HepaRG 単独培養と比較し、それぞれ 1.50 倍および 1.46 倍高かった(図 5)。また、共培養

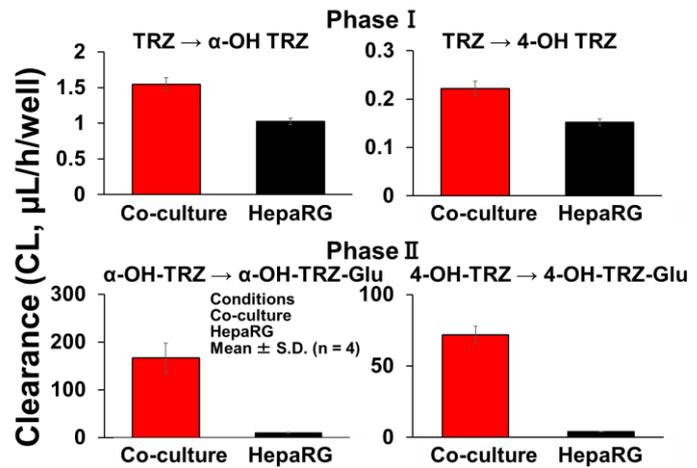


図5 HepaRG単培養とCaco-2共培養時のAUCベースで求めたクリアランスの変化

時の  $\alpha$ -OH および 4-OH triazolam-Glu 生成のクリアランスは、HepaRG 単独培養よりもそれぞれ 16.2 and 18.0 倍高かった。また、膜透過速度や代謝クリアランスを定量的に求めるため、膜透過や代謝クリアランス、デバイスへの吸着などを含むパラメーターを組み込んだ PBPK モデルを構築した。HepaRG 細胞と共培養での代謝実験時の triazolam およびその代謝物の濃度推移に基づき最適化を行ったところ、共培養を行った際の代謝クリアランス ( $CL_{int,\alpha\text{-OH}}$ 、 $CL_{int,4\text{-OH}}$ 、 $CL_{int,\alpha\text{-OH-Glu}}$ 、 $CL_{int,4\text{-OH-Glu}}$ ) の値は、HepaRG 単独培養と比較し、1.19、1.09、11.2、13.8 倍高く、モデル非依存的解析で得られたクリアランスと同様な結果となった。この推定されたパラメーターを用いた PBPK モデルをもとに、ヒトでの薬物動態の予測が可能であるかを調べた。モデルに生理学的 SF と経験的 SF を追加し、triazolam とその代謝物の血漿中濃度推移の予測と経験的 SF の最適化を行い、推定血漿中濃度推移と実測値の値が近い値を示した。

以上より、Caco-2 細胞の透過と HepaRG 細胞による 2 臓器連結 MPS によって HepaRG 単独培養と比較し、共培養時にグルクロン酸抱合のクリアランスが著しく増加することが明らかとなった。この結果は、単独臓器では再現することができない臓器間相互作用を引き起こすことができるという新たな可能性を示している。最後に、共培養での代謝実験の結果と、PBPK モデルを用い、triazolam とその代謝物の血漿中濃度推移を定量的に予測できる可能性も示された。

#### 【参考文献】

- 1) Kawanishi T, Arakawa H, Masuo Y, Nakamichi N, Kato Y. Bile Duct Obstruction Leads to Increased Intestinal Expression of Breast Cancer Resistance Protein With Reduced Gastrointestinal Absorption of Imatinib. *J Pharm Sci.* 2019 Sep;108(9):3130-3137. doi: 10.1016/j.xphs.2019.05.017.
- 2) Arakawa H, Sugiura S, Kawanishi T, Shin K, Toyoda H, Satoh T, Sakai Y, Kanamori T, Kato Y. Kinetic analysis of sequential metabolism of triazolam and its extrapolation to humans using an entero-hepatic two-organ microphysiological system. *Lab Chip.* 2020 Feb 7;20(3):537-547. doi: 10.1039/c9lc00884e.

# 審査結果の要旨

多くの薬物の体内動態には、複数の臓器が関与する。その場合、ある臓器に障害が発生すると他臓器が代償機構として機能変化することや、その結果として当該臓器に新たな負荷が発生する可能性がある。しかし、そのような臓器間の代償機構や相互作用は十分に解明されていない。本学位論文は、マウス胆管結紮 (BDL) モデルを用いた胆汁うっ滞時の小腸と腎臓での薬物動態変化に着目し代償機構の一端の解明を目指すとともに、腸肝モデル細胞搭載型 **microphysiological system (MPS)** を用い、複数細胞を共培養した際の薬物動態変化を調査することにより臓器間相互作用の解明を目指した。BDL は小腸における管腔側への薬物排出膜輸送体を増加させ、腎における血液側への薬物排出膜輸送体を減少させた。これらは、慢性骨髄性白血病治療薬 **imatinib** の消化管吸収の低下と腎への分布の著しい増加の一部を説明した。また、MPS においてヒト肝細胞モデル **HepaRG** による睡眠導入剤 **triazolam** 水酸化体のグルクロン酸抱合活性が、小腸モデル細胞 **Caco-2** との共培養により増加することを見出した。本論文は、胆汁うっ滞時の他臓器による薬物動態代償機構や、薬物代謝における共培養効果を提唱した点で、創薬科学分野での学術的価値があり、博士 (創薬科学) に値すると判定された。