

報告番号	甲 乙 第 号	氏 名	土谷 聡耀
<p>主 論 文 題 名 :</p> <p>Bottom-up 法による薬物の消化管吸収および消化管 P-gp を介した薬物間相互作用の定量的予測</p>			
<p>(内容の要旨)</p> <p>【序論】</p> <p>薬物の体内動態は、その薬物の有効性や安全性を決定する重要な因子である。薬物動態は臨床試験によって評価することが望ましいが、時間的、経済的、倫理的な制約を回避するため、薬物動態を <i>in silico</i> で予測する研究が進められている。</p> <p>薬物動態を予測するモデルは静的モデルと動的モデルに大別される。動的モデルは薬物動態の経時的に予測するものであり、医薬品開発において汎用されている。代表的な動的モデルである生理学的薬物測定論 (PBPK; physiological-based pharmacokinetics) モデルを用いると、薬物の膜透過性や酵素代謝速度のような薬物固有のパラメーターをもとにして、詳細な薬物動態をシミュレーションすることが可能である。薬物固有のパラメーターの決定方法は top-down 法と bottom-up 法に大別される。Top-down 法とは既知の <i>in vivo</i> データにシミュレーション結果が合致するように薬物固有のパラメーターを決定する方法である。一方、bottom-up 法では <i>in vitro</i> で得られたパラメーターを <i>in vivo</i> へ理論的かつ機構的に外挿すること (IVIVE; <i>in vitro</i>-to-<i>in vivo</i> extrapolation) が必要となる。Bottom-up 法により正確なシミュレーションを行うためには、生体機能を反映した <i>in vitro</i> パラメーターを再現性良く求めることが重要である。</p> <p>経口投与された医薬品の消化管吸収率 (Fa; fraction absorbed) は、その体内動態を決定する重要な因子である。一般的に Fa の予測には、細胞単層膜や人工脂質膜を用いた <i>in vitro</i> 評価から得られる見かけの透過係数 (P_{app}; apparent permeability) と既知 Fa の相関関係などを用いた静的モデルが汎用されている。しかし、静的モデルでは時間依存的な消化管吸収を予測することはできない。一方、既存の動的モデルである compartment absorption and transit (CAT) モデルは、消化管を直列に配された複数のコンパートメントとして扱い、ここを薬物が通過しながら血中へ吸収されることを模したモデルである。しかし、CAT モデルの各コンパートメントからの吸収クリアランスを bottom-up 法により求め Fa を定量的に予測することが可能な実験的手法はこれまで提示されてこなかった。</p> <p>代表的な排出トランスポーターである P 糖タンパク質 (P-gp; P-glycoprotein) は、消化管において临床上重要な多くの医薬品を基質とし、薬物の吸収に影響を与えるのみならず、その阻害を介して临床上重要な薬物相互作用 (DDI; drug-drug interaction) を引き起こす。しかし、消化管における P-gp を介した DDI を bottom-up アプローチにより定量的に予測する方法は確立されていない。そこでは、<i>in vitro</i> において得られる P-gp の輸送活性を、P-gp の絶対量で規格化することが一つの課題となる。したがって、消化管の部位ごとにトランスポーター介在性および非介在性 (単純拡散) の透過性を評価できれば、ヒトにおける薬物の Fa およびトランスポーターを介した DDI を定量的に予測可能と考えた。そこで本研究では、単純拡散とトランスポーター介在性輸送を個別に評価し消化管吸収や DDI を予測するというアプローチを目指し、これらの吸収経路を bottom-up 法で予測するためのモデルを構築することを目的とした。</p>			

第一章 単純拡散による消化管吸収の Bottom-up 予測に最適な実験系の探索

【背景・目的】

消化管吸収の動的モデルである CAT モデルでは、消化管の各コンパートメントからの吸収クリアランスを、消化管を単純な管として想定した場合の表面積あたりの吸収クリアランス (P_{eff} ; effective permeability) に当該コンパートメントの側面積を乗じた値として定義している。しかし、さまざまな実験手法のなかで、どれが bottom-up 法による P_{eff} 推定に最適かは比較検討されていない。そこで単純拡散で吸収される薬物について、さまざまな *in vitro* 実験系から得られた P_{app} あるいはラットにおいて得られた P_{eff} ($P_{\text{eff, rat}}$) を用いて、それぞれ bottom-up 法によってヒト P_{eff} に外挿し、 F_a の推定精度を比較することで、bottom-up 法による CAT モデルシミュレーションに最適な P_{eff} が得られる実験系を探索した。

【方法】

本研究では 6 つの消化管コンパートメントと門脈コンパートメントから成る CAT モデルを構築した。ヒト小腸上皮初代培養細胞 (HIEC; human intestinal epithelial cells) 単層膜、ヒト結腸癌由来細胞株 (Caco-2 細胞) 単層膜、人工脂質膜 (PAMPA; parallel artificial membrane permeability assay) の透過実験から得られた P_{app} を文献から収集した。ラット *in situ* 実験から得られた $P_{\text{eff, rat}}$ もまた、文献から収集した。対象薬物は単純拡散で吸収される、acyclovir、nadolol、sulpiride、hydrochlorothiazide、metformin、procainamide、timolol、propranolol、metoprolol、antipyrine、carbamazepine、imipramine の 12 種とした。*In vitro* 単層膜の単位表面積あたりの透過クリアランスである P_{app} を、ヒト消化管の輪状ひだと絨毛による表面積拡大率を乗じることで P_{eff} へ外挿した。

PAMPA は平坦な膜であるため、外挿にあたっては微絨毛による表面積拡大の考慮の有無も検討した。 $P_{\text{eff, rat}}$ はラット小腸の形態学的特徴に基づいてヒトの P_{eff} に外挿した (animal-scale up)。各薬物について各実験系から算出した P_{eff} を用いて CAT モデルシミュレーションを行い、算出された薬物吸収率 ($F_{\text{a, sim}}$) を実測値 ($F_{\text{a, obs}}$) と比較した。また、HIEC 単層膜から得られた P_{app} を用いたシミュレーションにおいて $F_{\text{a, sim}}$ と $F_{\text{a, obs}}$ の間に最も高い相関性が得られたことから、CAT モデルで得られた吸収速度の経時変化をもとにコンボリューション (畳み込み積分) を行い、経口投与後の血漿中濃度推移をシミュレーションし、実測値と比較した。全てのシミュレーションは Microsoft® Excel (バージョン 16.52) で行なった。

【結果・考察】

各実験系の P_{app} または $P_{\text{eff, rat}}$ を用いて得られた $F_{\text{a, sim}}$ と $F_{\text{a, obs}}$ の比較

12 種の薬物について、HIEC 単層膜から得られた P_{app} に基づいた $F_{\text{a, sim}}$ が $F_{\text{a, obs}}$ と最も良好に相関し、11 種が $F_{\text{a, obs}}$ の 1.3 倍範囲内に予測された。Caco-2 の P_{app} から推定した $F_{\text{a, sim}}$ は全ての低吸収性薬物 ($F_a < 80\%$) の F_a を過小評価した。これは Caco-2 細胞の形態学的特徴が一因と考えられる。PAMPA は微絨毛による表面積の拡大を考慮に入れても、 F_a を定量的に予測できなかった。さらに、薬物によって実験系間の予測誤差の程度や傾向が異なったことから、PAMPA は生体脂質膜を定量的に再現するものではないと考えられた。Animal-scale up を用いた場合、低吸収性薬物の F_a を過大評価した。消化管の形態学的種差のみならず、トランスポーターの基質認識性や $P_{\text{eff, rat}}$ を測定する条件が過大評価に関与していると考えられる。

コンボリューション法による経口投与時の薬物動態シミュレーション

HIEC 単層膜の P_{app} を用いた CAT モデルシミュレーションから得られた薬物の吸収速度と、ヒトにおける静脈内投与後の血漿中濃度推移のコンボリューションによって経口投与時の薬物動態をシミュレーションしたところ、予測値と実測値の最大血漿中濃度 C_{max} の比は全て 1.5 倍範囲内に収まり、良好な予測が得られた。HIEC 単層膜の P_{app} を用いることで、薬物の吸収動態を定量的に予測可能であると考えられる。

第二章 P-gp 依存的 ATPase 活性を用いた P-gp 発現細胞における薬物の経細胞的透過の予測**【背景・目的】**

In vitro における薬物の P-gp 基質性の指標としては、P-gp 発現細胞単層膜の basal (B) to-apical (A) (B-to-A) と A-to-B 方向の P_{app} の比である efflux ratio などが用いられる。しかし、細胞を用いて P-gp そのものの輸送キネティクスを定量的に測定することは困難である。そこで本研究では細胞を用いない P-gp 輸送能評価系として P-gp 発現膜小胞に着目し、P-gp 依存的 ATPase 活性 (P-gp-ATPase) をもとにした IVIVE の可能性を検討した。すなわち、IVIVE の第一段階として P-gp 依存的 ATPase 活性と P-gp の発現量をもとに、P-gp 発現細胞層を介した基質の透過を予測することを試みた。

【方法】P-gp 発現膜小胞を用いた P-gp の基質依存的 ATPase 活性の評価

Dabigatran etexilate (DABE)、edoxaban (EDX)、digoxin (DGX) の 3 種のモデル基質を対象に、ヒト P-gp 発現膜小胞を用いて基質依存的 ATPase 活性を評価した。得られた無機リン酸 (iP; inorganic phosphate) 生成速度と基質濃度との関係から、見かけのミカエリス定数 ($K_{m,app}$) と最大反応速度 (V_{max}) を求めた。また、膜小胞中の P-gp 含量を LC-MS/MS で定量し、これにより V_{max} を規格化した。 K_m は、 $K_{m,app}$ に Austin の式より推定した非結合型分率を乗じることで算出した。

P-gp 基質の P-gp 発現細胞単層膜透過試験

P-gp 発現 LLC-PK1 細胞 (LLC-GA5-COL300) 単層膜における各基質の A-to-B と B-to-A の透過性 (P_{cell} ; trans-cell monolayer permeability) を、P-gp 阻害剤 (10 μ M CsA; cyclosporine A) 存在下および非存在下で測定した。Donor コンパートメントの濃度は 0.25 μ M (DABE) あるいは 1 μ M (EDX, DGX) とした。P-gp が薬物を細胞内から apical 側へ輸送する膜透過モデルを構築し、CsA 存在下の A-to-B の透過から経膜的な透過クリアランス (P_{mem} ; trans-membrane permeability) を算出した。CsA 存在下の A-to-B と B-to-A の透過の差は細胞間隙透過クリアランス (P_{para} ; paracellular permeability) と仮定した。

P-gp 発現細胞における培養面積あたりの P-gp 絶対発現量の算出

LLC-GA5-COL300 細胞から plasma membrane (PM) 画分を抽出し、画分中の P-gp 絶対発現量を LC-MS/MS で定量した。細胞破碎液 (WCL; whole cell lysate) と PM 画分の alkaline phosphatase (ALP) の活性比から、培養表面積あたりの PM 回収率を求め、これを用いて培養面積あたりの P-gp 絶対発現量を算出した。

P-gp-ATPase 活性の P-gp 発現細胞への外挿と経細胞的透過の予測

算出した P-gp 絶対発現量と、ATPase 活性で評価した規格化 P-gp 輸送活性から、細胞単層膜上の P-gp 輸送活性を算出した。続いて、膜透過モデルにしたがって A-to-B と B-to-A の CsA 非存在下における P_{cell} を予測した。予測した P_{cell} および P-gp 阻害による P_{cell} の変化 (ΔP_{cell}) を実測値と比較した。

【結果・考察】**P-gp 発現膜ベシクルにおける P-gp 基質依存的 ATPase 活性**

すべての基質において、ATPase 活性は濃度依存的に上昇した。DABE、EDX、DGX の $K_{m,app}$ (μM , geometric mean [-1 SD~+1 SD]) はそれぞれ 0.224 [0.120~0.419]、37.7 [25.2~56.5]、57.6 [50.3~66.1] であった。また、 V_{max} はそれぞれ 3.81 ± 0.842 、 4.27 ± 0.0714 、 5.37 ± 0.335 (fmol iP / fmol P-gp/sec, mean \pm S.D.) であった。

LLC-GA5-COL300 細胞における培養面積あたりの P-gp 絶対発現量の推定

LLC-GA5-COL300 細胞から回収された PM タンパク質量、PM および WCL の総タンパク質量と ALP 活性から、培養面積当たりの P-gp 絶対発現量は $493 \text{ fmol P-gp/cm}^2$ と算出された。

A-to-B および B-to-A 方向の P_{cell} 、 ΔP_{cell} 予測

A-to-B 方向 P_{cell} の予測値の実測値に対する比は DABE、EDX、DGX のそれぞれで 0.0894、1.01、0.497 であり、 ΔP_{cell} についてはそれぞれ 1.01、0.990、2.04 であった。B-to-A 方向については、予測 P_{cell} の実測値に対する比は DABE、EDX、DGX で 0.683、0.778、1.04 であり、 ΔP_{cell} についてはそれぞれ 1.30、0.316、1.19 であった。特に A-to-B 方向の ΔP_{cell} について良好に予測できたことから、P-gp-ATPase 活性は P-gp 絶対発現量に基づいて細胞における P-gp 輸送活性に外挿可能であると考えられ、P-gp-ATPase 活性は IVIVE のツールとして有用である可能性が示された。

第三章 P-gp 依存的 ATPase 活性の IVIVE に基づいた消化管 P-gp を介した DDI シミュレーション**【背景・目的】**

第二章において、P-gp-ATPase 活性と細胞における P-gp の絶対発現量から、細胞における P-gp 輸送活性を外挿可能であることが示された。そこで本章ではさらに、P-gp-ATPase 活性を Bottom-up 法によって *in vivo* に外挿し、DABE、EDX、DGX の消化管 P-gp 阻害を介した DDI を予測した。

【方法】

第一章で用いた CAT モデルに小腸上皮細胞コンパートメントとヒト小腸における P-gp 絶対発現量を組み込んだ。規格化した P-gp-ATPase 活性を各コンパートメントにおける P-gp 輸送活性に外挿した。単純拡散のパラメーター (P_{pass}) は top-down 法、つまりヒト臨床試験における F_a ($F_{a,obs}$) とシミュレーション値が一致するように設定した。以上の条件下、P-gp を完全に阻害 ($V_{max}=0$) したときの F_a 上昇比 (simulated F_a ratio; $F_{aR_{sim}}$) をシミュレートし、実測値 (observed F_a ratio; $F_{aR_{obs}}$) と比較した。

【結果・考察】**P-gp-ATPase 活性の Bottom-up 法から得られた $F_{aR_{sim}}$ と $F_{aR_{obs}}$ の比較**

Top-down 法により決定した DABE、EDX、DGX の P_{pass} はそれぞれ 21.3、2.66、 $4.92 (\times 10^6 \text{ cm/s})$ だった。DABE、EDX、DGX の $F_{aR_{sim}}$ はそれぞれ 2.40、1.09、1.11 と $F_{aR_{obs}}$ (それぞれ 2.52、1.29、1.15) を良好に予測することができた。すべての基質で $F_{aR_{sim}}$ はわずかに過小評価する傾向にあったが、P-gp-ATPase 活性が P-gp の輸送活性を過小評価されている可能性や、CAT モデルにおいて大腸からの吸収を考慮しなかったために小腸における単純拡散の吸収を過大評価した可能性が考えられる。特に過小評価の程度が大きかった EDX については P-gp が胆汁排泄に関与しているため、腸肝循環をモデルに組み込むことで $F_{aR_{sim}}$ の予測精度は改善されるかもしれない。

【結論】

本研究では消化管吸収の単純拡散と P-gp 輸送のそれぞれを bottom-up 法によって良好に予測する手法を検討し、それらを統合することで P-gp 介在性 DDI の IVIVE の達成を試みた。第一章において、HIEC 単層膜から得られた P_{app} は薬物の吸収性に関わらず、bottom-up 法でヒト Fa を定量的に予測できることを CAT モデルシミュレーションによって示した。第二章において、消化管 P-gp の輸送活性を bottom-up 法で求める手法として P-gp-ATPase 活性測定に着目した。代表的な 3 種の P-gp 基質について、P-gp 絶対発現量で規格化した P-gp-ATPase 活性を P-gp 発現細胞における P-gp 輸送活性に外挿し、P-gp 基質の経細胞的透過や P-gp 阻害による透過の変化を予測することに成功した。第三章では規格化した P-gp-ATPase 活性を bottom-up 法で *in vivo* に外挿し、DABE、EDX、DGX の消化管 P-gp を介した DDI を予測することに成功した。これらの手法を組み合わせることで薬物の消化管吸収や消化管トランスポーターを介した DDI を定量的に予測することが可能であり、複雑な消化管内挙動を予測する研究の一助となることが期待される。