

カニクイザル チトクロム P450 2C19 分子種の遺伝子多型の ワルファリン薬物動態に及ぼす影響に関する研究

鵜藤 雅裕

緒言

カニクイザル（サル）は進化的にヒトに近く、生理学的にヒトとの類似性が高いことから、医薬品開発の非臨床試験において広く使用されている。ヒトおよびサルでの主要な薬物代謝酵素はチトクロム P450（総称を P450、個別分子種を CYP と記す）であり、中でも CYP3A および CYP2C 酵素群は薬物代謝への関与が大きい。ヒトおよびサルの CYP3A 酵素は、共に基質認識性が類似し、脂溶性の高い薬物を代謝することから、創薬段階からサルを用いて CYP3A 基質薬物のヒトでの薬物動態の予測を試みる研究がなされている。一方、CYP2C については、ヒトとサルの基質認識性に若干の差があり、霊長類同士でありながら稀に薬物代謝の種差が認められる。さらにヒトでは CYP2C 酵素遺伝子多型が薬物動態の個人差の主因のひとつとなり、サルを用いて CYP2C 基質薬物のヒト薬物動態の予測をする際には留意する必要がある。近年、サル CYP2C9 (mCYP2C9)、mCYP2C19 および mCYP2C76 の各分子種についての *in vitro* 基質認識性に関する網羅的な検討がなされた。薬物代謝酵素遺伝子多型についても mCYP2C9 および mCYP2C19 の遺伝子多型に関する *in vitro* 研究がなされ、サル薬物酵素活性の個体差も判明しているが、*in vivo* での遺伝子多型の薬物動態に及ぼす影響は全く検討されていない。そこで本研究では、mCYP2C 分子種のうち遺伝子多型頻度の高い mCYP2C19 の遺伝子多型の薬物動態に及ぼす影響に関する *in vivo*、*in vitro* および *in silico* 検討を行い、サルにおける薬物代謝酵素遺伝子多型の非臨床研究における意義を明らかにすることを目的とした。

1. サル肝におけるワルファリンの *in vitro* 代謝の検討

S-ワルファリンはヒト CYP2C9 (hCYP2C9) により立体選択的に S-7-水酸化体に変換され、その体内動態は hCYP2C9 の遺伝子多型の影響を受けることが知られている。しかし、サルでのワルファリン立体選択的な代謝情報は得られていない。そこで、ヒトおよびサル肝でのワルファリンの *in vitro* 代謝を比較した。サルでの主要代謝経路は R-ワルファリン 7-水酸化反応で、ヒトとは異なる立体選択性を示した。サル肝 S-ワルファリン 7-水酸化酵素活性はヒト肝のそれと概ね同程度であるが、R-7-水酸化反応は効率的であり、S 体と比べて有意に高い水酸化酵素活性を示した (図 1)。20 個体のサル肝を用いたリアクションフェノタイピング、14 種の組換え mP450 分子種を用いた 6-/7-水酸化酵素活性の比較、および速度論的解析等の結果を総合すると、サルにおいて R-ワルファリンは主に mCYP2C19 により立体選択的に R-7-水酸化体に変換されるが、S-ワルファリンは複数の P450 分子種により代謝されることが明らかとなった。

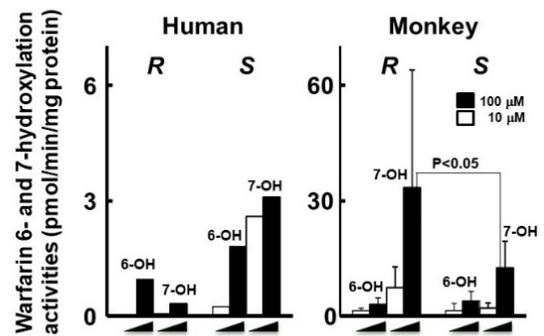


図 1 ヒトおよびサル肝の R-/S-warfarin 6-/7-水酸化活性

2. mCYP2C19 遺伝子多型を持つサルを用いた ワルファリンの *in vivo* 薬物動態の検討

mCYP2C19 [p.Phe100Asn, p.Ala103Val および p.Ile112Leu] の遺伝子多型を持つサル 11 頭 (野生型 4 頭、変異ヘテロ接合体 4 頭、変異ホモ接合体 3 頭) にワルファリンラセミ体を 1.0 mg/kg の用量で静脈内および経口投与し、血漿中未変化体および R-/S-6-/7-水酸化ワルファリン濃度を液体クロマトグラフ質量分析装置を用いて測定した。mCYP2C19 遺伝子変異は R-/S-ワルファリンの 11 個体の、薬物動態 (PK) パラメータのうち、吸収、分布または生物学的利用率 (BA) には影響を及ぼさ

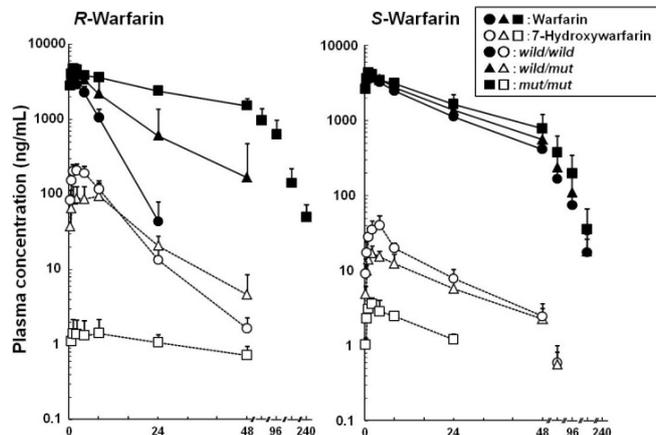


図 2 遺伝子多型サルにおけるワルファリン経口投与後の血漿中 R-/S-ワルファリンおよび R-/S-水酸化ワルファリン濃度推移

なかった。*S*-ワルファリンの PK パラメータには変異ホモ接合体群と野生型群間の有意な差は認められなかった。一方、経口投与後の変異ホモ接合体群の血漿中 *R*-ワルファリンの消失半減期 $t_{1/2}$ は野生型群のそれに比べて約 11 倍、 AUC_{inf} 値は約 8 倍高かった。*mCYP2C19* による代謝に依存して生成した *R*-7-水酸化ワルファリンの血中濃度推移はきわめて低く、その AUC_{inf} 値は野生型群のその約 1/27 で、有意な差が認められた (図 2)。以上の結果より、*mCYP2C19* 遺伝子多型はサル *in vivo* における *R*-ワルファリン薬物動態に影響を及ぼすことが明らかとなった。

3. 生理学的薬物動態 (PBPK) モデルによる *R*-ワルファリン薬物動態解析と予測

mCYP2C19 遺伝子多型の *R*-ワルファリン薬物動態に及ぼす影響を定量的に評価するため、個体ごとに PBPK モデルを構築した。このモデルを用い、仮想投与後に得られる血漿中濃度値と実測値を比較したところ、両者それぞれから算出した AUC_{0-24} は良好な相関性を示した (図 3A)。個体ごとの PBPK モデル構築で得られた仮想投与曲線の指標を用いる一元配置分散分析の結果、変異ホモ接合体、変異ヘテロ接合体および野生型群間で、*R*-ワルファリンの $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-24} および *in vivo* 肝クリアランス ($CL_{h, in vivo}$) に *mCYP2C19* の遺伝子変異による有意な差が認められた。さらに同一個体から採取したサル肝を用いて個体ごとの *in vitro* 肝クリアランス ($CL_{h, in vitro}$) を求めたところ、変異ホモ接合体群の $CL_{h, in vitro}$ は、有意に低値を示し、個体それぞれの $CL_{h, in vitro}$ と $CL_{h, in vivo}$ には相関関係が認められた (図 3B)。以上、*R*-ワルファリンは分布容積が小さく、主に肝の *mCYP2C19* による代謝で消失する肝固有クリアランス律速型薬物であるため、*mCYP2C19* の遺伝子変異による *mCYP2C19* の代謝クリアランスの顕著な低下は、直接的に *R*-ワルファリンの全身クリアランスの低下となり、ひいては *R*-ワルファリンの *in vivo* 薬物動態に大きな影響を及ぼしたものと判断された。本研究で構築した PBPK モデルを用いる方法は、*R*-ワルファリンに類似した動態特性を有する化合物にも適用可能で、非臨床試験の *in vivo* 薬物動態の予測や解釈に役立つものと推察される。

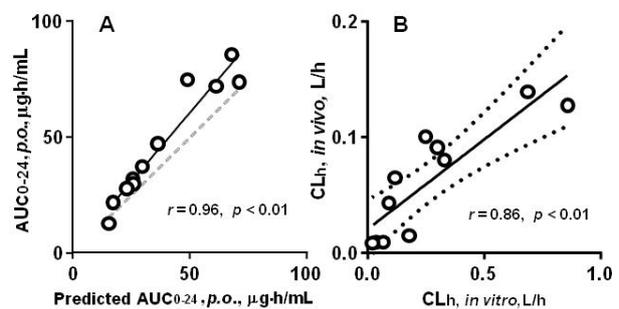


図 3 PBPK モデルによる AUC_{0-24} の予測値と実測値の相関 (A) *in vitro* 肝クリアランスと *in vivo* 肝クリアランスの相関 (B)

結論

R-ワルファリンはサルでは主に遺伝子多型性を示す *mCYP2C19* により立体選択的に *R*-7-水酸化体に変換されることを明らかにした。サルでのワルファリン動物体内血中濃度データ、同一個体肝試料による試験管内代謝消失速度および実測値を再現する仮想動物 PBPK モデル用肝クリアランス (肝代謝消失) 値のいずれも、*mCYP2C19* 遺伝子多型に応じて変動することを明らかにした。この *mCYP2C19* 遺伝子多型の *R*-ワルファリンの薬物動態に及ぼす影響を定量的に評価する PBPK モデルは、*in vivo* 薬物動態をも予測し得る方法であることを示した。以上、ヒトと同様に、サルにおける薬物代謝酵素遺伝子多型の非臨床研究における意義を明らかにした。さらに医薬開発候補品の動態特性、薬物代謝酵素遺伝子多型による代謝能の低下、代謝酵素の寄与率等の *in vitro* の情報を組み込んだ PBPK モデルを活用しサル等の薬物体内動態を解析する本手法は、医薬開発候補品の薬物動態と薬効・毒性の明確化のみならず、非臨床試験の計画立案と開発の効率化、臨床薬物動態予測、さらに医薬品の適正使用領域にも応用可能であると推察される。

本研究の誌上発表

- Hosoi Y, Uno Y, Murayama N, Fujino H, Shukuya M, Iwasaki K, Shimizu M, Utoh M, and Yamazaki H (2012) Monkey liver cytochrome P450 2C19 is involved in *R*- and *S*-warfarin 7-hydroxylation. *Biochem Pharmacol* 84:1691-1695.
- Utoh M, Yoshikawa T, Hayashi Y, Shimizu M, Iwasaki K, Uno Y, and Yamazaki H (2015) Slow *R*-warfarin 7-hydroxylation mediated by P450 2C19 genetic variants in cynomolgus monkeys *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 95:110-114.
- Utoh M, Kusama T, Miura T, Mitsui M, Kawano M, Hirano T, Shimizu M, Uno Y, and Yamazaki H (2018) *R*-Warfarin clearances from plasma associated with polymorphic cytochrome P450 2C19 and simulated by individual physiologically based pharmacokinetic models for 11 cynomolgus monkeys. *Xenobiotica* 48:206-210.