

創薬・創剤における探索動態研究の役割と課題

布施英一

協和発酵工業株式会社医薬研究センター薬物動態研究所

1. はじめに

弊社では、1990年代初期より探索ステージにおける動態研究の体制を整備してきた。特に、1996年から探索動態専門のグループを立ち上げ、欧州の製薬会社での経験を有するコンサルタントと契約し、1年に1-2回のコンサルティングを実施し、欧米の製薬会社の探索動態の方法論を取り入れてきた。また、アカデミアとの共同研究を通じて、トランスポータを中心に新しい評価系の導入も積極的に進め、レベルアップを図ってきた。演者は2001年から探索動態グループの主任研究員の一人として、複数のプロジェクトにおいて探索段階の動態スクリーニング、低分子化合物の最適化、開発候補化合物の絞込み・評価に携わってきた。

本発表では、2001年以降に経験してきた探索動態研究におけるハードルのいくつかをご紹介します。現時点で取り得る最適な方法論や今後導入、整備が必要と思われる創薬技術や方法論について一緒に考えていきたい。

2. どのように探索動態を行い、化合物の最適化に貢献するか？

探索テーマが立ち上げられ、スクリーニングなどにより、いわゆるヒット化合物が見出されると、薬理、物性、毒性、動態の初期評価を行い、最適化に向けたリード化合物となり得るかどうかを評価する。近年、High-Throughput Screening (HTS)の技術により多くの化合物が瞬時に評価されるが、脂溶性や分子量が高い化合物がその非選択性からヒット化合物として見出されることが多い。このヒット化合物が満足しうる動態を示す例は稀である。近年は、いわゆるビッグファーマを中心に動態スクリーニングの自動化などのHTS化が進み、ヒト肝ミクロソームや肝細胞を用いた代謝スクリーニング、ヒト大腸癌由来のCaco-2細胞やParallel Artificial Membrane Permeation Assay (PAMPA)を用いた消化管膜透過性スクリーニング、96穴プレートを用いた溶解度スクリーニングなどを平行して進める製薬企業も多々見受けられる。in silico (計算による予測)による評価も積極的に導入されている。弊社の探索動態の進め方の特徴は、これら大手製薬企業の戦略に比べると評価項目の絞込みにあると思われる。動態スクリーニングを始める前に我々はこのヒット化合物の動的な欠点がどこにあるかを見出すための評価を行う。低いバイオアベイラビリティ (B. A.)を示す化合物の場合に、高い肝代謝クリアランス、低い溶解性や膜透過性による低吸収、高い胆汁排泄クリアランスなどの原因を見出し、改善すべき項目を絞り込む。初期の誘導体展開が実施され、複数の化合物が評価可能な場合には、in vitro の評価系と in vivo での結果との相関、いわゆる in vitro-in vivo correlation (IVIVC)を検討し、動態スクリーニング実施項目を決定する。

弊社での化合物の最適化の一般的なフローの例を図1に示す。本戦略のメリットは、リ

ソースを効率的に利用できることと合成担当者がどの物性、部分構造に着目して動態最適化を検討すべきかが分かりやすいことにある。デメリットは、評価項目以外の課題への取り組みの遅れや評価すべき項目の変化への対応の遅れである。代謝安定性が獲得された化合物の膜透過性が低下していたり、高い胆汁排泄クリアランスが主消失機構となっていたりする例を経験してきた。消化管代謝で苦勞する例も多々ある。最初に選んだスクリーニング項目に固執することなく、多くの動態特性にバランスよく配慮するセンスが探索動態の研究者には求められる。以下、我々が経験した動的な問題点を紹介する。特に断らない限り、評価には雄性の動物を用いた。

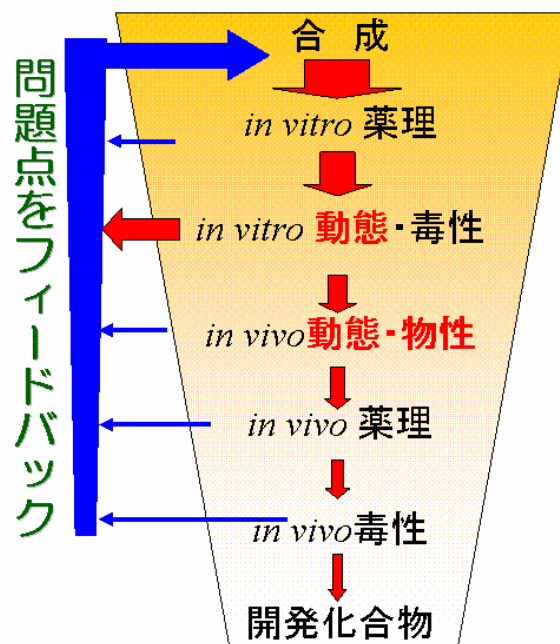


図1 探索段階における化合物の最適化のフロー

3. サルにおける全身クリアランスが肝血流速度を超えたら？

薬理評価動物がマウスであったプロジェクトにおいて、当初のリード化合物はマウス肝ミクロソーム代謝固有クリアランス (CL_{int}) が 300 L/h/kg を超える、肝代謝消失型の化合物であった。ヒト肝ミクロソームでの CL_{int} は 3 L/h/kg であり、著しく高値ではなかったが、マウスでの薬効評価のための化合物の絞込みも必要であり、マウスとヒトの肝ミクロソームを用いたスクリーニングを行い、代謝的に安定な化合物 A が見出された。適宜、in vivo PK 評価を行ってきたこともあり、マウスに経口投与したときの曝露も高く、薬理評価において著効を示し、開発候補化合物として選択された。ヒト肝ミクロソームでの CL_{int} は 1.2 L/h/kg であり、低くはないものの、評価を中止すべきとは思われなかった。

毒性評価用動物として、ラットでの PK 評価やヒト肝細胞での評価を進めるにつれ、いくつかの不安材料が見出されてきた。特に、以下の点が注目された。

- a. ヒト肝細胞における CL_{int} がミクロソームの値の 2-3 倍であった (ラットは逆)。
- b. ラットの in vivo PK における全身クリアランス (CL_{tot}) から補外される CL_{int} は肝ミクロソームの値の約 20 倍であった。

b. については、血漿懸濁肝細胞を用いた評価によりほぼ解決できた。すなわち、ラット肝細胞での CL_{int} は約 0.06 L/h/kg であったが、血漿懸濁肝細胞での CL_{int} は約 0.4 L/h/kg であり (いずれも非結合型薬物濃度換算)、in vivo から補外された値の 1/3 程度となった。ヒトでは血漿懸濁肝細胞を用いても結果は変わらず、結果として a. の疑問は残った。

続いて、毒性評価のためのサルでの PK 評価を実施した。その CL_{tot} は肝血流速度を上回るものであった。詳細は省略するが、その後の評価により肝以外の組織にも存在する、チトクローム P450 (CYP) 以外の代謝酵素により代謝されることが明らかとなり、サルおよびヒトにおいてのみ高活性の代謝が認められた。CYP や肝細胞 (ミクロソーム) を中心とした評価であったために、見落とされた動態特性であった。

4. 腎クリアランスがラットに比べサルで高かったら？

有機アニオン化合物をリードとしたプロジェクトの化合物群の主消失機構は、ラットやサルを用いた in vivo PK 評価により、腎排泄であることが明らかとなっていた。腎排泄については、効率的なスクリーニング系がないことから、カセット投与も併用しながら、ラットの in vivo を中心に PK 評価を行ってきた。リード化合物 B のラットにおける CL_{tot} は約 0.5 L/h/kg であり、腎クリアランス (CL_R) は約 0.3 L/h/kg であった。必ずしも高クリアランス化合物ではないものの、低分布容積であり、短い消失半減期 ($t_{1/2}$) が課題であった。スクリーニングの結果、 CL_{tot} 、 CL_R がそれぞれリード化合物の約 1/7、1/90 に低下した化合物 C が見出された。しかし、残念ながらサルでの動態、 CL_{tot} に明らかな改善は認められず、 CL_R の低下は 1/3 程度であった。

その後、腎への取り込み側で機能している主な organic anion transporter である Oat-1 や Oat-3 についての種差の解析^{1,2}を東京大学の杉山先生の研究室との共同研究として行うと共に、ラットの腎排泄の性差 (organic anion transporting polypeptide 1 (Oatp1) の発現) についての報告³に基づき、雌性ラットでの化合物 C の動態評価を行った。 CL_{tot} に明らかな性差は認められなかったものの、雌性ラットの CL_R は雄性ラットの約 3 倍であった。プロジェクトの中止にともない、詳細な動態評価は中断したが、化合物 C は雄性ラットの腎尿細管に発現している Oatp1 の基質であり、再吸収のために CL_R が低下したと推定した。また、サルとヒトの Oat-3 の基質認識性は近いのに対し、ラットとヒトでは異なることも考え合わせると、仮に臨床試験に進んだとしてもヒトでは短い $t_{1/2}$ だったのではないかと考えている。

5. サルで消化管利用率がラットに比べ低かったら？

マウスに 10 mg/kg を経口投与したときの B. A. および門脈血中濃度より算出された肝利用率 (F_H) がいずれも約 25% である化合物 D をリードに代謝スクリーニングを実施し、化合物 E を見出した。化合物 E の同じ投与量での F_H は 85%、B. A. は約 80% であったが、1 mg/kg では B. A. が約 20% に低下したのに対し、 F_H は約 60% であり、消化管利用率 ($F_a \cdot F_g$) は約 40% と算出された。ラット、サルを用いた評価も行った。サルでは 30 mg/kg でも B. A. は 10% 未満であり、3 mg/kg では最高血漿中濃度 (C_{max}) が検出できる程度であった。 CL_{tot} が肝クリアランス (CL_H) に等しいと仮定して算出した F_H および $F_a \cdot F_g$ はそれぞれ約 70% および 10% であり、低い

消化管利用率が示唆された。ラット反転腸管リングを用いた代謝実験、ヒト p-glycoprotein (p-gp) 発現細胞を用いた評価により、それぞれ消化管での代謝、p-gp による排出が認められた。ラットにケトコナゾールを併用投与すると、化合物 E の血漿中濃度が上昇することが確認され、B. A. は約 20%から約 70%に上昇した。

CYP3A の基質であり、肝 CL_{int} が 6 L/h/kg を超える化合物の消化管利用率はヒトにおいても低下することが示唆されていること⁴から、化合物 E を臨床開発に進めるのはリスクが高いと判断された。

6. ヒト肝細胞でヒト肝マイクロソームに比べ安定だったら？

リード化合物のグルクロン酸抱合代謝の克服が主な課題であったプロジェクトにおいて、補酵素として uridine diphosphoglucuronic acid (UDPGA) を添加した肝マイクロソームを用いて代謝スクリーニングを実施した。reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) を添加した条件も併せて実施し、ヒト肝マイクロソームでの CL_{int} が約 3 L/h/kg に低下した化合物 F が見出された。ヒト肝細胞を用いて代謝安定性の確認を行ったところ、化合物 F の代謝が認められなかった。肝細胞における取り込みや排出の可能性を考え、p-gp 阻害剤を添加したところ、肝細胞での代謝が認められた。p-gp 発現細胞を用いた評価においても basolateral 側から apical 側への排出方向の輸送が確認された。

p-gp 阻害剤とは薬物間相互作用を生じる可能性があり、併用薬については注意を要すると判断された。

7. 肝代謝、腎排泄以外のクリアランスが認められたら？

酸化代謝が主な消失経路であった化合物群について、IVIVC を検討した。しかし、残念ながら良好な IVIVC は得られず、2 極化が認められた(図 2)。

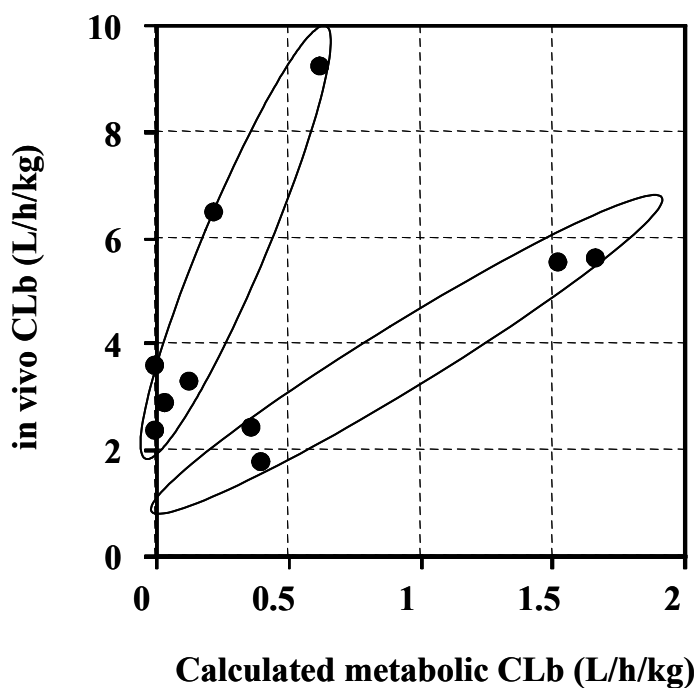


図2 in vitro 代謝クリアランスと in vivo 全身クリアランスとの相関

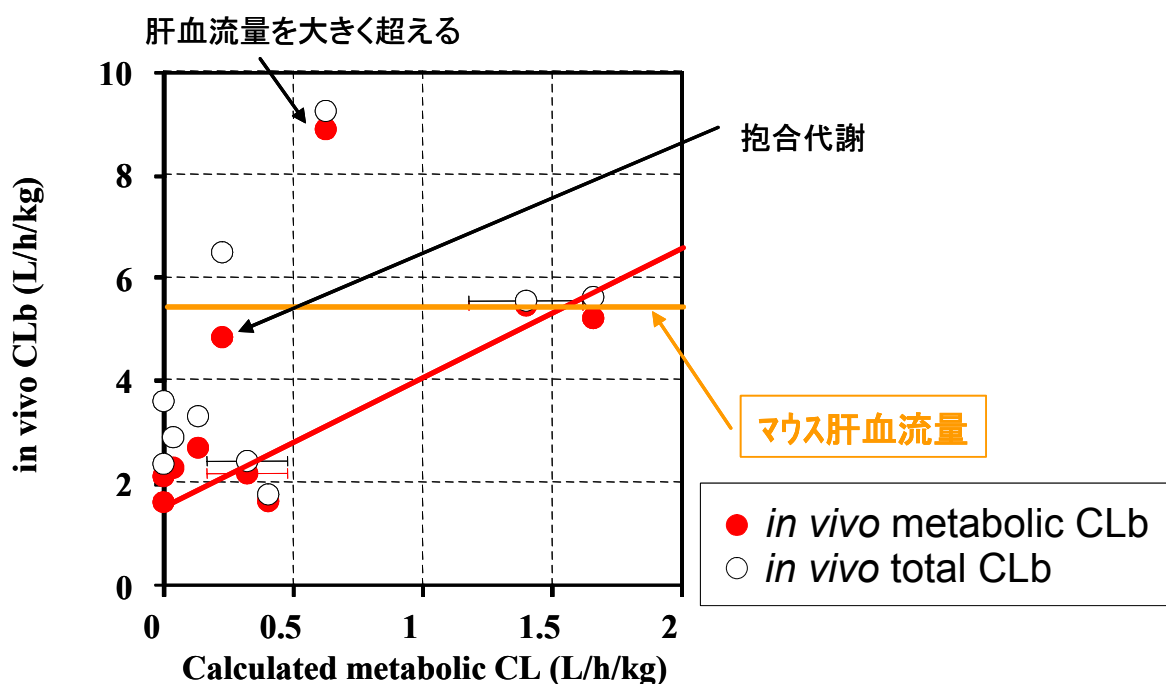


図3 in vitro 代謝クリアランスと in vivo 代謝クリアランスとの相関

他の消失経路を再検討したところ、いくつかの化合物において未変化体の胆汁排泄が14-35%認められた。その割合を差し引いて再度 IVIVC のプロットをしたところ、相関は向上した(図3)。相関から大きく外れる2化合物の1つは抱合代謝の寄与によるものであることが判明したが、もう一つの化合物についての原因は不明である。

消失経路における胆汁排泄の寄与が高い場合、ヒトへの外挿は困難となる。本プロジェクトにおいては、別の理由により中止されたが、開発候補化合物が選択された場合にヒトでの動態を予測することは困難であったと思われる。

8. 今後への提言

弊社でここ数年の間に経験してきた探索段階で動態の評価、予測に苦労した例を紹介してきた。肝臓の CYP を中心とした肝ミクロソームや肝細胞を用いた代謝、Caco-2 や PAMPA を用いた吸収性の評価、トランスポーターの発現細胞などを用いた取り込みや排出に関する評価が多く企業の企業において活用されてきた。結果として、動的に優れた化合物が選択され、ヒトにおける動態予測もある程度可能となり、臨床段階で薬物動態を理由に開発が中止される割合は減少してきた。

一方で、消化管代謝や非 CYP 代謝などの肝外代謝、トランスポーターが関与する腎臓や肝臓からの排泄などについては、ヒトでの予測はまだ困難と言わざるを得ない。これらの評価は、ヒトでの検証が困難であり、予測が的確だったかどうかの情報を蓄積できない点も大きなハードルと考えられる。

この解決策の一つは、評価ツールの充実と検証の蓄積と思われる。ヒトの肝マイクロソームや肝細胞の入手が容易になり、これらのツールと実験動物での in vitro と in vivo との関係の詳細な研究の蓄積により、肝臓での CYP 代謝については、かなりの確度でヒトでの動態予測が可能になったと言える。消化管については、肝臓に比べ入手のハードルは高く、加えて代謝活性を維持した状態のマイクロソームなどを調製することが必ずしも容易ではなく、IVIVC の妨げになっている。排泄になるとさらに困難である。発現系で評価するには複数のトランスポータのそれぞれの寄与や関係を見積もる必要があり、腎スライスなどを用いるには入手のハードルがやはり高いことが問題となる。臨床試験において、経口投与などの適用経路で血漿中濃度を評価するだけでなく、静脈内投与や尿中や糞中への排泄の評価も行い、情報を蓄積することが一つの解決策につながるかもしれない。

根本的な解決策の一つとして注目されているのが、マイクロドーズ(MD)試験に代表される探索臨床試験である。紙面の関係で詳細は述べないが、今後の情報の蓄積や国内での実施の基盤整備が期待される。ただし、MD 試験が気軽にできる環境が整ったとしても、探索段階での化合物の最適化のための探索動態研究は必須であり、MD 試験に進める化合物を非臨床試験から選択する役割と責任が動態研究者に残ることは間違いない。個人的には MD 試験に頼らずに、自信を持ってヒトの動態を予測できるように今後も研究を継続していきたい。

1. Tahara H., Kusuhara H., Chida M., Fuse E., Sugiyama Y. Is the monkey an appropriate animal model to examine drug-drug interactions involving renal clearance? Effect of probenecid on the renal elimination of H₂ receptor antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316:1187-94, 2006.
2. Tahara H., Shono M., Kusuhara H., Kinoshita H., Fuse E., Takadate A., Otagiri M., Sugiyama Y. Molecular cloning and functional analyses of OAT1 and OAT3 from cynomolgus monkey kidney. *Pharm. Res.* 22:647-60, 2005.
3. Kato Y., Kuge K., Kusuhara H., Meier P.J., Sugiyama Y. Gender Difference in the Urinary Excretion of Organic Anions in Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302:483-9, 2002.
4. 千葉康司, 加藤基浩, 永田吉範, 植田 薫, 高桑 奨, 塚本友子, 加山 誠, 水野尚美, 石神未知, 樋坂章博, 楠原洋之, 杉山雄一, CYP3A と Pgp 基質のヒト小腸における初回通過代謝: 文献情報の定量的解析, 第 16 回日本薬物動態学会年会 S177, 2001