

アドメノート

薬物動態研究における実験材料及び
評価系開発の最近の動向

名古屋市立大学大学院薬学研究科

松永民秀



肝細胞、腎尿管上皮細胞、小腸上皮細胞、脳血管内皮細胞、心筋細胞、神経細胞などのヒトの試料は、創薬研究の薬物動態試験や毒性試験において極めて有用な実験材料であるが、入手が困難な場合が多く、たとえ入手できたとしてもロット間差が大きいうえに、量も限られている。近年、胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)などの多能性幹細胞がヒトより樹立され、生体を構成する全ての細胞に分化する能力を秘めていることから、創薬研究における新しい実験材料として注目されている。特に、肝細胞への分化については数多くの研究が行われており、薬物動態試験や毒性試験への利用が大いに期待されている^{1,2)}。一方、生体の様々な組織にある組織幹細胞(体性幹細胞、成体幹細胞)は、分化の方向性がある程度決まっているため多能性幹細胞と比較して分化能は限られているが、高い増殖性を維持しており、目的とする細胞への分化が比較的容易であるという利点がある。その中で、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell)は、本来間葉系に属する細胞(骨細胞、心筋細胞、軟骨細胞、腱細胞、脂肪細胞など)への分化能を持っているが、最近グリア細胞(外胚葉由来)や肝細胞(内胚葉由来)など、胚葉の差をこえて中胚葉性でない組織にまで分化できる可塑性を持っていることが示された³⁾。間葉系幹細胞から分化誘導された肝細胞様細胞は、薬物代謝活性や薬物代謝酵素の誘導能を有しており、薬物動態研究の有望な材料の1つとして興味が高まっている^{4,5)}。

肝臓は再生能力に優れた代表的な臓器である。しかし、成人の肝細胞を体外で培養した場合、増殖能力が殆ど無いばかりか、肝細胞特異的な機能が急激に低下し、それを維持することさえ困難である⁶⁾。種差があることから、臨床でのヒトでの薬物の挙動を予測するためにヒト細胞を用いた試験が必要不可欠とされている。そのためヒト凍結肝細胞を使用するケースが年々増加している。しかしながら、通常の培養方法あるいは装置でヒト肝細胞を培養すると、プレートに接着しにくく、生体に近い機能を維持することができないことから長期の薬物代謝や毒性試験には不向きである。これまで、三次元細胞培養装置、浮遊(スフェロ

イド)培養法、サンドイッチ培養法など生体環境に少しでも近づけるための培養技術の開発が進んできた⁷⁻⁹⁾。このような技術は、貴重で高価なヒト試料の有効利用に繋がるだけでなく、幹細胞の肝細胞への分化誘導において、肝特異的機能を獲得・維持することにも利用できる大変貴重な技術である。

一方、細胞培養技術を用いた *in vitro* 研究ではなく、ヒト化動物を作成することによる *in vivo* での薬物動態試験を行う系も確立されている。その中で最も代表的なものがヒト肝細胞を持つキメラマウスであろう。このマウスは、肝臓に障害を持つ albumin enhancer/promoter urokinase plasminogen activator トランスジェニックマウス(uPAマウス)と免疫不全の SCID マウスを掛け合わせ、どちらの形質もホモ接合体である uPA/SCID マウスであり、ヒトの肝細胞を移植することで80%がヒト肝細胞に置換した肝臓を持つ¹⁰⁾。このヒト肝細胞を持つキメラマウスは、既に薬物動態研究において高い評価を得ている¹¹⁻¹³⁾。一方、ヒト人工染色体(HAC)技術を基にさまざまな遺伝子の機能を解析するツールとして HAC ベクターが開発された。この HAC ベクターシステム技術を利用し、ヒトの医薬品代謝において最も重要な酵素である CYP3A 遺伝子クラスターを導入した CYP3A ヒト型マウスが作製された。本マウスは、肝臓と小腸にヒト CYP3A を発現したモデル動物としてヒトにおける CYP3A を介した薬物相互作用や薬物代謝が血中動態に及ぼす影響を *in vivo* で予測する新規モデルとして注目されている。

薬物の多くは複数の代謝酵素により代謝を受けると共に、薬物や代謝物の細胞内への取り込みや排泄にはトランスポーターが関与している。また、発現には多くの転写因子が複雑に関与しており、受容体には種差があることも知られている。ヒト肝細胞を持つキメラマウスはヒト肝細胞そのものであることから、薬物動態試験や毒性試験において薬物代謝酵素や薬物トランスポーター等の関与や相互作用を総合的に評価できる実験材料として優れている。しかし、少量残っているマウスの肝細胞の影響を無視できない場合もあることが知られているし、*in vivo* と言っても経口投与で問題となる小腸での評価は出来ない。一方、CYP3A-HAC マウスの場合では薬物代謝で重要な CYP3A が小腸と肝臓に発現していることから、小腸での代謝も解析できる特徴がある。しかし、HAC マウスでは人工染色体を導入して発現した酵素により解析することになり、その他の代謝酵素との関わりや誘導評価における転写因子あるいは受容体については今後の課題かと思われる。

各種オミックス技術は、創薬研究において重要な地位を占めてきた。その中でメタボロミクスは、大規模な発現プロファイリングやプロテオーム研究を論理的に補完するものとして急速に浸透している手法である。この技術は、あ

る遺伝子，または生理的・病理的環境が異なった複数の系において多数の構成分子を網羅的・包括的に分析し，そのプロファイルを比較することにより，細胞のある瞬間の生理的・病理的現象に最も関与する可能性の高い因子を明らかにすることができる^{14,15}。しかし，代謝物は化学的にきわめて多様であることから，メタボミクスには分析上の大きな困難が伴う。その困難を克服する技術として，高感度と高分離能を兼ね備えたLC-MS/MSなど質量分析装置があげられる。

新しい実験材料や評価系の開発は，これまで困難だった薬物動態研究を容易にすることで，その予測精度を増すことになり，延いては安全で有効な医薬品の開発に資することになる。そこで，本シリーズは各分野の専門の先生により，第1回「多能性幹細胞と組織幹細胞」，第2回「3次元培養・マイクロ組織形成技術」，第3回「ヒト化モデル動物」，第4回「質量分析装置」で紹介して頂く予定である。

参考文献

- Hannoun, Z., Filippi, C., Sullivan, G., Hay, D. C. and Iredale, J. P.: Hepatic endoderm differentiation from human embryonic stem cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, **5**: 233-244 (2010).
- Ochiya, T., Yamamoto, Y. and Banas, A.: Commitment of stem cells into functional hepatocytes. *Differentiation*, **79**: 65-73 (2010).
- Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A. and Verfaillie, C. M.: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, **418**: 41-49 (2002).
- Ishikawa, T., Banas, A., Hagiwara, K., Iwaguro, H. and Ochiya, T.: Stem cells for hepatic regeneration: the role of adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, **5**: 182-189 (2010).
- Enosawa, S., Yamada, Y., Takatsu, H., Suzuki, S. and Ochiya, T.: Highly significant CYP activities of hepatocyte-like cells differentiated from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Abstracts of 25th JSSX Annual Meeting in Tokyo*, p. 275 (2010).
- Mitaka, T.: The current status of primary hepatocyte culture. *Int. J. Exp. Pathol.*, **79**: 393-409 (1998).
- 嶋田 薫：創薬一化合物を医薬品にするために必要な薬物動態研究の意義と実践. 日本薬理学雑誌, **133**: 210-213 (2009).
- 山田泰弘：創薬におけるヒト肝細胞の問題点. *Organ Biology*, **13**: 119-135 (2006).
- Enosawa, S., Miyamoto, Y., Hirano, A., Suzuki, S., Kato, N. and Yamada, Y.: Application of cell array 3D-culture system for cryopreserved human hepatocytes with low attaching capability. *Drug Metab. Rev.*, **39**: 342 (2007).
- Tateno, C., Yoshizane, Y., Saito, N., Kataoka, M., Utoh, R., Yamasaki, C., Tachibana, A., Soeno, Y., Asahina, K., Hino, H., Asahara, T., Yokoi, T., Furukawa, T. and Yoshizato, K.: Nearcompletely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am. J. Pathol.*, **22**: 901-912 (2004).
- Katoh, M. and Yokoi, T.: Application of chimeric mice with humanized liver for predictive ADME. *Drug Metab. Rev.*, **39**: 145-157 (2007).
- Katoh, M., Tateno, C., Yoshizato, K. and Yokoi, T.: Chimeric mice with humanized liver. *Toxicology*, **246**: 9-17 (2008).
- Kamimura, H., Nakada, N., Suzuki, K., Mera, A., Souda, K., Murakami, Y., Tanaka, K., Iwatsubo, T., Kawamura, A. and Usui, T.: Assessment of chimeric mice with humanized liver as a tool for predicting circulating human metabolites. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **25**: 223-235 (2010).
- Kaddurah-Daouk, R., Kristal, B. S. and Weinshilboum, R. M.: Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **48**: 653-683 (2008).
- Wang, T., Shah, Y. M., Matsubara, T., Zhen, Y., Tanabe, T., Nagano, T., Fotso, S., Krausz, K. W., Zabriskie, T. M., Idle, J. R. and Gonzalez, F. J.: Control of steroid 21-oic acid synthesis by peroxisome proliferator-activated receptor α and role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J. Biol. Chem.*, **285**: 7670-7685 (2010).