

博士論文

オベチコール酸によるCYP1A2ダウンレギュレーションに関する研究

広島大学 大学院医歯薬保健学研究科
医歯薬学専攻
生体機能分子動態学研究室
石田 千尋
主指導教員 古武 弥一郎

目次

略語一覧.....	3
緒言.....	4
本論.....	8
第一章 オベチコール酸の CYP1A2 に対する影響.....	8
第一節 序論.....	8
第二節 オベチコール酸の CYP1A2 阻害能評価.....	10
第三節 オベチコール酸がヒト凍結接着肝細胞の CYP1A2 mRNA 及び代謝活性に及ぼす影響.....	11
第四節 オベチコール酸曝露による細胞死への影響.....	15
小括.....	16
第二章 オベチコール酸の CYP2B6 及び CYP3A4 に対する影響.....	18
第一節 序論.....	18
第二節 オベチコール酸がヒト凍結接着肝細胞の CYP2B6 mRNA、代謝活性に及ぼす影響.....	19
第三節 オベチコール酸がヒト凍結接着肝細胞の CYP3A4 mRNA、代謝活性に及ぼす影響.....	22
第四節 オベチコール酸の CYP3A4 直接阻害能の評価.....	25
小括.....	26
第三章 オベチコール酸が酵素誘導下 CYP1A2 および CYP1A2 制御因子に及ぼす影響.....	28
第一節 序論.....	28
第二節 オベチコール酸がオメプラゾール酵素誘導下 CYP1A2 mRNA、代謝活性に及ぼす影響.....	30
第三節 オベチコール酸が CYP1A2 転写制御因子の mRNA に及ぼす影響.....	33
小括.....	34
総論.....	35
実験方法.....	38
引用文献.....	42
本論文に関連した学会発表.....	47
本論文の基礎となる原著.....	47
謝辞.....	48

略語一覽

AhR : aryl hydrocarbon receptor
AhRR : aryl hydrocarbon receptor repressor
Arnt : aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
AUC : area under the concentration-time curve
AUC_{0-∞} : area under the concentration-time curve from time zero to infinity
CAR : constitutive androstane receptor
CYP : cytochrome P450
DDI : drug-drug interactions
DMSO : dimethylsulfoxide
EMA : European Medicines Agency
FDA : U.S. Food and Drug Administration
FXR : farnesoid X receptor
GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPLC : high performance liquid chromatography
HSP90 : heat shock protein 90
LC-MS/MS : HPLC tandem mass spectrometry
LDH : lactate dehydrogenase
LRH-1 : liver receptor homologue-1
3-MC : 3-methyl-cholanthrene
MSPK : mechanism-based static pharmacokinetic
β-NADPH : reduced β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
OCA : obeticholic acid
PMDA : Pharmaceutical and Medical Devices Agency
PXR : pregnane X receptor
SHP : small heterodimer partner
TCDD : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin
XRE : xenobiotic responsive element

緒言

Cytochrome P450 (CYP) は医薬品を含む生体異物を代謝する酵素で、医薬品の体内からの消失に主要な役割を果たしている。CYP3A4 は肝臓において最も多く発現している分子種であり、ヒト肝ミクロソームに発現するCYPの約16%を占める。また、肝臓にはCYP3A4以外にもCYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6及びCYP2E1など様々な分子種が発現している (Kawakami *et al.*, 2010)。このうちヒト体内で薬物代謝を担っている主要な分子種はその発現量および医薬品の化学構造との基質特異性に依存して決定され、CYP3A4、CYP2D6、CYP2C9、CYP1A2およびCYP2B6等が挙げられる (Zanger *et al.*, 2013)。

医薬品によるCYPの代謝活性変化は薬物間相互作用 (drug-drug interactions ; DDI) の1つであり、変動対象のCYPで代謝される併用医薬品の薬物動態に影響を与え、期待していた薬効を減弱させたり重篤な副作用を惹起させたりするおそれがある (Pelkonen *et al.*, 2008 ; Yu *et al.*, 2018)。臨床では治療のために複数の医薬品を併用処方することが多いことから、各医薬品のDDIリスクが適切に評価され情報提供されることは、臨床における医薬品の適正使用にとって重要である。創薬の現場である製薬企業が新薬を開発するにあたっては、医薬品候補化合物の持ちうるDDIの性質とその程度を適切に予測評価することは必須であり、予測精度が開発化合物の開発中止に直結する危険性もある。

製薬企業が医薬品候補化合物のDDIリスクを評価する際、各規制当局 (European Medicines Agency (EMA)、U.S. Food and Drug Administration (FDA)、Pharmaceutical and Medical Devices Agency (PMDA)) のDDIガイダンスおよびガイドラインを参照する。各DDIガイダンスおよびガイドラインには、標準的な *in vitro* 評価方法や臨床試験のデザインおよび意思決定時の判断基準となるカットオフ値や決定樹が当時の科学的背景を踏まえて可能な限り詳細に示されている。例えば、酵素誘導はCYPの転写活性化を促進することでその活性を増大させ、被相互作用薬の血漿中濃度および血中濃度-時間曲線下面積 (Area under the concentration-time curve ; AUC) を低下させるおそれのあるDDIの一種であるが、医薬品候補化合物の酵素誘導評価では *in vitro* 評価によって得られるパラメータを用いた判断や静的薬物速度論モデル、生理学的薬物速度論モデルを活用した判断など、複数の手法を段階的に活用する決定樹に従って臨床薬物相互作用試験の必要性を検討することができる。また、*in vitro* 評価手法に対しても、ヒト凍結接着肝細胞を用いたCYP1A2、CYP2B6及びCYP3A4 (CYP3A4で酵素誘導が認められた場合はCYP2C系の分子種についても実施) のmRNA発現変動および代謝活性変動を評価する旨がポジティブコントロールの化合物例と共に記載されている。各DDIのメカニズムや *in vitro-in vivo* 外挿性の基礎研究が推進され知見が深まることで、DDIガイダンスおよびガイドラインの判断基準や決定樹が改善されることは、開発化合物が有する臨床DDIリスクの予測精度向上につながり、最終的には医薬品開発の成功確率の上昇および医薬品の適正使用に貢献するものと期待される。

CYPダウンレギュレーションは酵素誘導と逆の現象で、CYPの転写活性化を抑制することで活性を減少させ被相互作用薬の血漿中濃度およびAUCを増加させるおそれのあるDDIである (Fig. 1)。CYPダウンレギュレーションと同様にCYPの活性を減少させることで被相互作用薬の血漿中濃度やAUCを増加させる可能性があるDDIとしては、CYP阻害が知られている。

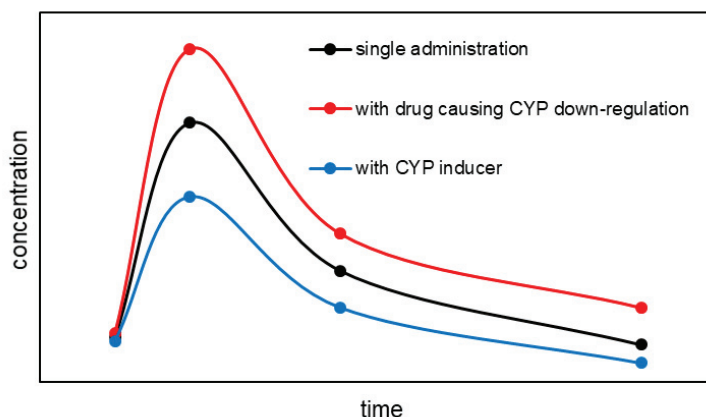


Fig. 1. Change of pharmacokinetic profile with typical CYP substrate (Conceptual figure).

CYPダウンレギュレーションは酵素誘導や阻害とは異なり、医薬品による報告事例が少なくDDI研究において新しい分野であり、統合的な理解が得られていない。著者は、報告される論文をベースに医薬品および医薬品候補化合物によってCYPダウンレギュレーションが示唆される事例を集約した (Table 1)。例えば、Sagerらはヒト *in vivo* でブプロピオンを併用した場合にCYP2D6 典型基質のAUC上昇が認められた現象について、*in vitro*で認められたブプロピオン及びその代謝物による弱いCYP2D6阻害能だけでは説明できないと考え、ヒト接着肝細胞を用いてブプロピオンおよびブプロピオンの代謝物が *in vitro* CYP2D6ダウンレギュレーションのポテンシャルを有していることを発見し、阻害とダウンレギュレーションの両方を考慮することで *in vitro* から *in vivo* への予測精度が向上したと報告している (Sager *et al.*, 2017)。さらにファイザー社の開発化合物 LY2090314は、細胞死および阻害を起こさない濃度でヒト凍結接着肝細胞のCYP2B6 mRNAおよび代謝活性を減少させ、CYP1A2やCYP3A4には影響を与えないことから、CYP2B6を特異的にダウンレギュレーションさせる可能性が示唆されている (Zamek-Gliszczyński *et al.*, 2014)。しかしながら、ヒト凍結接着肝細胞を用いた *in vitro* 評価で認められた13-シス-レチノイン酸によるCYP2D6ダウンレギュレーションはヒト *in vivo* には反映されなかったという報告もある (Stevison *et al.*, 2019)。このように、CYPダウンレギュレーションの *in vitro-in vivo* 外挿性を検証するには事例数が不十分であるのが現状である。

日本の「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドラインに関する質疑応答集 (Q&A)」では、*in vitro* 酵素誘導試験でmRNAが対照群に対して濃度依存的に50%以上減少し、それが細胞毒性に起因するものではないと考えられる場合、該当する酵素のダウンレギュレーションが示唆されるが、現状では薬物により生じるダウンレギュレーションと発現メカニズムに関する知見は限定的であるため、*in vitro* で濃度依存的なダウンレギュレーションが観察された場合は

臨床薬物相互作用試験で検討することが推奨される旨が明記されている。また、EMAガイドラインでも同様の記載がなされており、CYPダウンレギュレーションに関する評価のための決定樹は、知見が十分ではなく、いまだに成熟していないと考えられる。

Table 1 Observations of CYP down-regulation by drugs and new chemical entities.

Compounds	Enzymes	Animals	<i>in vitro/in vivo</i>	References
sulpiride	CYP1A2	rat	<i>in vivo</i>	Harkitis <i>et al.</i> , <i>PLoS ONE</i> . 2015
	CYP1A1			
	CYP1B1			
telithromycin	CYP1A2	rat	<i>in vivo</i>	Nosaka <i>et al.</i> , <i>Life Sciences</i> . 2006
	CYP3A2			
LY2090314	CYP2B6	human	<i>in vitro</i> (hepatocyte)	Zamek-Gliszczyński <i>et al.</i> , <i>Drug Metab Dispos</i> . 2014
metformin	CYP2B6	human	<i>in vitro</i> (hepatocyte)	Yang <i>et al.</i> , <i>Mol Pharmacol</i> . 2014
carfilzomib	CYP3A4	human	<i>in vitro</i> (hepatocyte)	Wang <i>et al.</i> , <i>Drug Metab Dispos</i> . 2013
GW4064	CYP3A4	human	<i>in vitro</i> (hepatocyte)	Zhang <i>et al.</i> , <i>Drug Metab Dispos</i> . 2015
metformin	CYP3A4	mouse	<i>in vivo</i>	Krausova <i>et al.</i> , <i>Biochem Pharmacol</i> . 2001
		human	<i>in vitro</i> (hepatocyte)	
capecitabine	CYP2C9	human	<i>in vivo</i>	Ramírez <i>et al.</i> , <i>Clinical Pharmacol</i> . 2019
fluorouracil	CYP2C9	human	<i>in vivo</i>	Gilbar <i>et al.</i> , <i>Ann Pharmacother</i> . 2001
bupropion	CYP2D6	human	<i>in vitro</i> (hepatocyte, HepG2)	Sager <i>et al.</i> , <i>Biochem Pharmacol</i> . 2017
			<i>in vivo</i>	
GW4064	CYP2D6	mouse	<i>in vivo</i>	Pan <i>et al.</i> , <i>Drug Metab Dispos</i> . 2015

一方で、海外の大手製薬企業等が参加している Innovation and Quality コンソーシアムの Drug Metabolism Leadership Group は、医薬品開発の薬物動態スクリーニングとして実施された *in vitro* 誘導試験全体のうち 10 から 20% で CYP ダウンレギュレーションが確認されたというアンケート結果を報告している (Hariparsad *et al.*, 2017)。また、同報告において対象分子種は、酵素誘導で評価対象となっている分子種の全ての分子種が含まれており (CYP1A2, 27.3%; CYP2B6, 27.3%; CYP3A4, 36.4%; CYP2C8/9, 6.8%)、現在開発中の医薬品候補化合物によって CYP ダウンレギュレーションは特定の分子種に偏ることなく起こり得る可能性が示されている。すなわち、医薬品開発現場においては少なからず *in vitro* CYP ダウンレギュレーションが認められる事例が報告されており、各製薬企業は *in vitro* の酵素誘導スクリーニングで濃度依存的な CYP ダウンレギュレーションが医薬品候補化合物で認められた場合には、少ない知見からそのメカニズムや臨床における影響を考慮しなければならないのが現状である。したがって、これまでのヒト *in vivo* 臨床薬物相互作用試験の結果などから、CYP ダウンレギュレーションを引き起こしている可能性がある事例を集約し、それを検証化合物として *in vitro* でのメカニズム検証や、*in vivo* への外挿を検証していくことは重要であると考えられる。

本研究では、CYP1A2の典型基質であるカフェインと原発性胆汁性胆管炎治療剤であるオベチコール酸 (Fig. 2) との臨床薬物相互作用試験結果に着目した (Edwards *et al.*, 2017)。25 mgのオベチコール酸を投与5日目から23日目まで併用投与する臨床デザインにおける投与21日目時点でのカフェインのクリアランスは単独投与時と比較して低下し、 $AUC_{0-\infty}$ は65%増加したと報告されている。Day21時点でも併用していることから、オベチコール酸がCYP1A2を阻害している可能性もあるが、CYP1A2ダウンレギュレーションを惹起した結果、カフェインのAUCが増大した可能性も考えられた。本研究におけるヒト凍結接着肝細胞を用いた*in vitro*評価でもオベチコール酸によるCYP1A2ダウンレギュレーションが確認されれば、オベチコール酸は*in vitro*、*in vivo*の両方でCYP1A2ダウンレギュレーションを起こす検証化合物として、評価法構築やメカニズム検討等に利用できると期待される。またCYP1A2は医薬品の代謝における主要分子種のひとつであり、酵素誘導の評価対象となっていることから、酵素誘導の知見を組み合わせた検討も期待される。

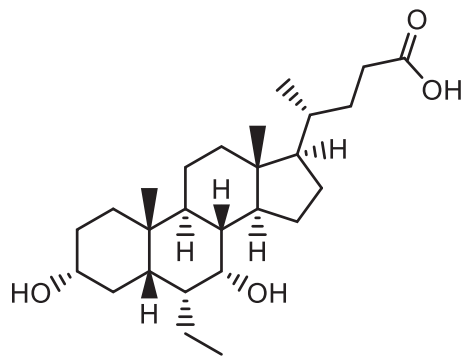


Fig. 2. Chemical structure of obeticholic acid.

以上より、本研究では、オベチコール酸がCYP1A2ダウンレギュレーションを惹起する可能性を考え、オベチコール酸がヒト凍結接着肝細胞を用いた*in vitro*評価においてCYP1A2ダウンレギュレーションを惹起するか精査することを目的とした。

本論

第一章 オベチコール酸のCYP1A2 に対する影響

第一節 序論

CYP阻害およびCYPダウンレギュレーションに伴う代謝活性低下は、いずれも変動対象のCYPで代謝される併用医薬品のAUCを上昇させ、併用医薬品による重篤な副作用の発現を起こすおそれがあるDDIである。本章では、オベチコール酸のCYP1A2 に対する影響として、オベチコール酸のCYP1A2阻害能およびCYP1A2ダウンレギュレーション惹起能を評価することを目的とした。

CYP の阻害様式は、可逆的阻害と時間依存的阻害に大別される (Pelkonen *et al.*, 2008)。可逆的阻害は阻害薬が存在している場合にのみ生じ、阻害薬濃度が低下すると阻害作用は消失する。しかし、時間依存的阻害は体内から阻害薬が消失しても作用が持続する。時間依存的阻害のメカニズムには薬物代謝酵素によって生じた活性の高い反応性中間代謝物がCYPと共有結合を形成して不可逆的に不活化させる *mechanism-based inhibition* などが挙げられ、新規CYPの生合成が活性回復に必要となるため、阻害剤が体内から消失してもすぐに阻害作用は消失しない。ヒト肝ミクロソームを用いた代謝阻害試験では、対象となるCYPの典型基質の代謝反応に、評価化合物を同時曝露することで可逆的阻害が、さらに同時曝露の前にプレインキュベーションを実施した場合の変化によって、時間依存的阻害を評価することができる。本研究では、ヒト肝ミクロソームを用いたCYP1A2典型基質フェナセチンのO-脱アルキル化反応により生成する代謝物アセトアミノフェンの濃度を指標とし、オベチコール酸を同時曝露、もしくは同時曝露の前にプレインキュベーションを実施することで、オベチコール酸のCYP1A2阻害能を評価した。

各当局から発出されている各DDIガイダンスおよびガイドラインでは、標準的な *in vitro* 酵素誘導評価方法としてヒト凍結接着肝細胞を用いることとされている。そして、CYP活性は個人差が大きいと、ヒト凍結接着肝細胞の機能はドナー間差があることが知られており、3ドナー以上のロットを使用して評価すること、および評価化合物によるmRNAや代謝活性の発現変動は、各肝細胞ロットで対照群（溶媒添加を曝露したサンプル）と比較した相対変化（*fold induction*）で評価することが推奨されている。

Richartらはヒト肝細胞にCYP1A2酵素誘導のポジティブコントロールである3-methylcholanthrene (3-MC) を曝露した際のCYP1A2 mRNA発現変動およびCYP1A2 代謝活性変動の相関を評価している (Richart *et al.*, 2009)。曝露24時間後および72時間後のCYP1A2 mRNA発現変動は、いずれも曝露後72時間のCYP1A2代謝活性変動と良好な正の相関が認められており、mRNA発現変動の評価時間は24時間点と72時間点のいずれも問題ないことが提唱されている。したがって、CYP1A2酵素誘導が惹起されているヒト肝細胞では、CYP1A2 mRNA発現、CYP1A2 タンパク質発現及びCYP1A2 代謝活性は正の相関があることが推察される。また、各当局から発出されている

各DDIガイダンスおよびガイドラインに関する記述は、代謝活性を指標した評価では被験薬の酵素阻害作用により酵素誘導を見落とす危険性があることから、代謝活性ではなく標的遺伝子のmRNA発現変動を指標とすることが推奨されている。このようなことから、曝露時間には規定はないものの、24時間から72時間程度曝露することが一般的とされている。

本章では、各DDIガイダンスおよびガイドラインに記載された*in vitro*酵素誘導試験方法を参照し、24wellコラーゲンプレートに播種した5ドナーのヒト凍結接着肝細胞にオベチコール酸を曝露し、48時間後のCYP1A2 mRNA発現変動および72時間後のCYP1A2代謝活性変動を評価することにより、オベチコール酸のヒト凍結接着肝細胞に発現するCYP1A2への影響を検討した。

第二節 オベチコール酸のCYP1A2阻害能評価

NADPH添加ヒト肝ミクロソームを用いてオベチコール酸のCYP1A2阻害能を評価したところ、オベチコール酸はプレインキュベーションの有無に関わらず、10 μM まではCYP1A2を阻害しなかった。しかし、100 μM オベチコール酸はプレインキュベーション実施条件のみにおいて、有意にCYP1A2を阻害した (Fig. 3)。

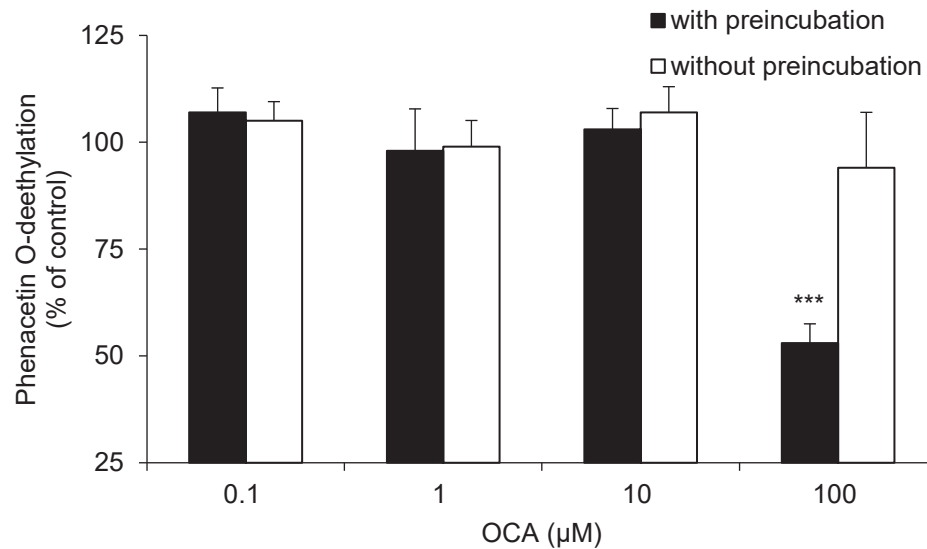


Fig. 3. Assessment of direct interaction of OCA with CYP1A2 in human liver microsomes. phenacetin *O*-deethylation as a measure of CYP1A2 activity in the presence of OCA with or without a 20-min preincubation with the OCA. Points represent percent metabolite formation compared to vehicle-treated control (0.1% DMSO); * $p < 0.001$ versus control (0.1% DMSO).**

第三節 オベチコール酸がヒト凍結接着肝細胞のCYP1A2 mRNA及び代謝活性に及ぼす影響

24wellコラーゲンプレートに播種した5ドナーのヒト凍結接着肝細胞に、オベチコール酸（1、10 および 100 μM ）またはコントロールとして媒体である0.1% dimethylsulfoxide (DMSO) を曝露した。48時間曝露後のCYP1A2 mRNA発現変動をreal-time PCRにより、72時間曝露後のCYP1A2代謝活性をCYP1A2典型基質フェナセチン*O*-脱アルキル化反応で生成する代謝物アセトアミノフェンの培地中濃度をLC-MS/MSで測定することにより評価した。その結果、全ての濃度においてオベチコール酸によりCYP1A2 mRNA発現は有意に低下し (Fig. 4A)、CYP1A2代謝活性も0.5倍以下に有意に低下していることが示された (Fig. 4B)。また、使用した5つの肝細胞ロットの個体値についても、全てのロットについて概ね同様の傾向が認められた (Fig. 5)。

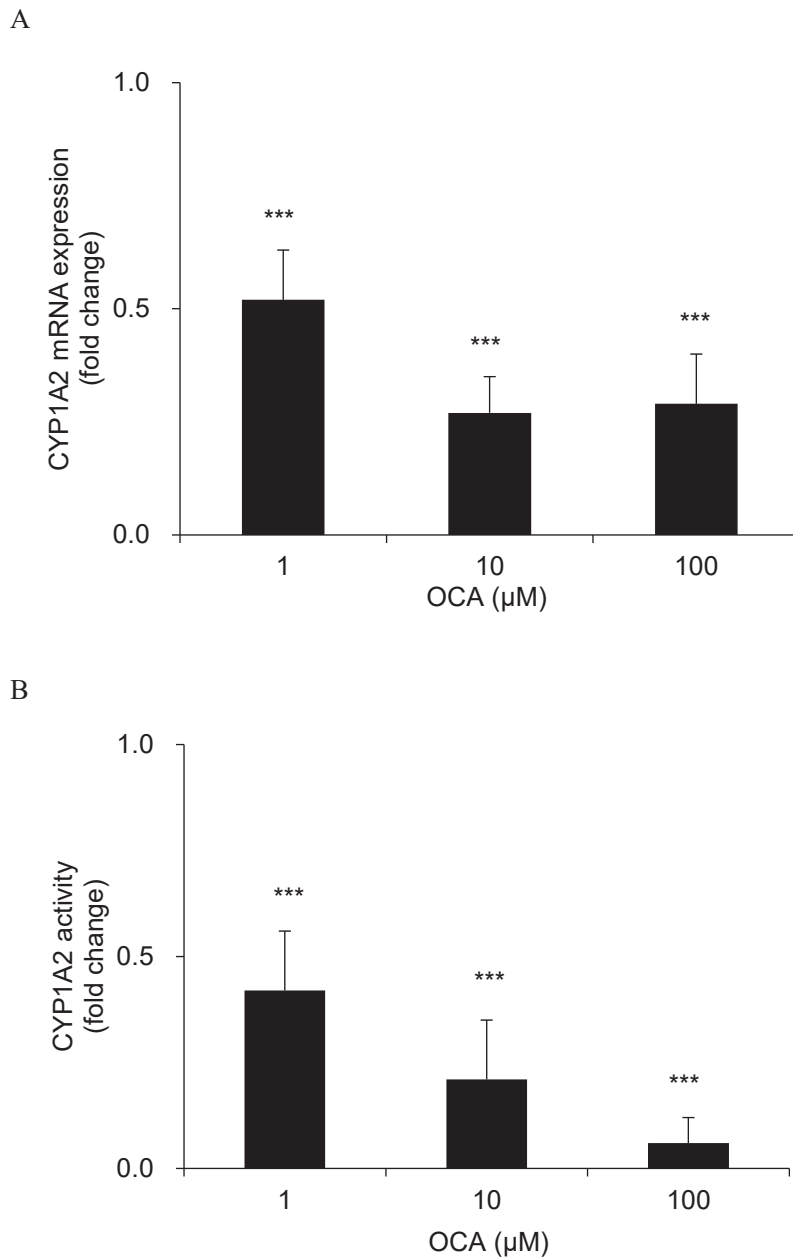
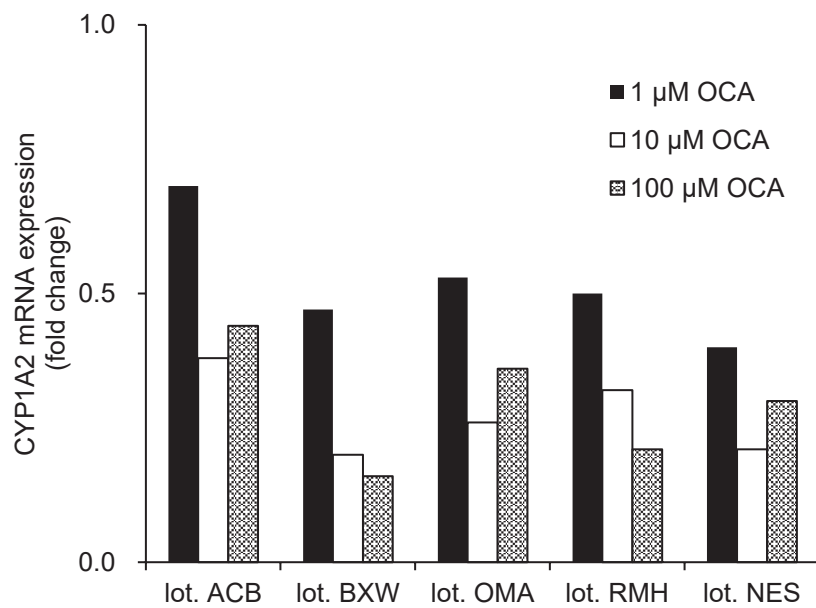


Fig. 4. Effect of OCA on CYP1A2 mRNA levels and enzyme activity. (A) Fold change in CYP1A2 mRNA expression compared to vehicle-treated control (0.1% DMSO) after 48 h of incubation. (B) phenacetin *O*-deethylation as a measure of CYP1A2 activity after 72 h of incubation. Mean + S.D. of preparations of hepatocytes from five donors; * $p < 0.001$ versus control (0.1% DMSO).**

A



B

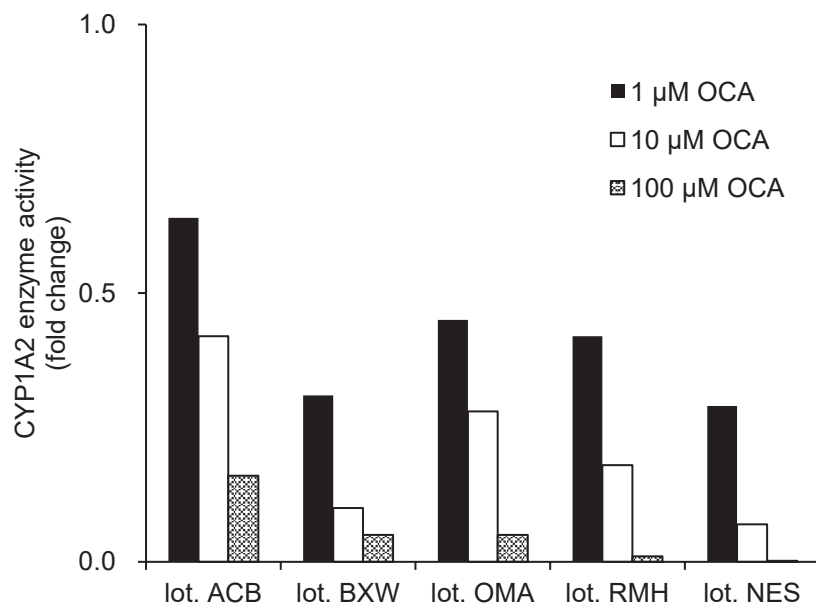
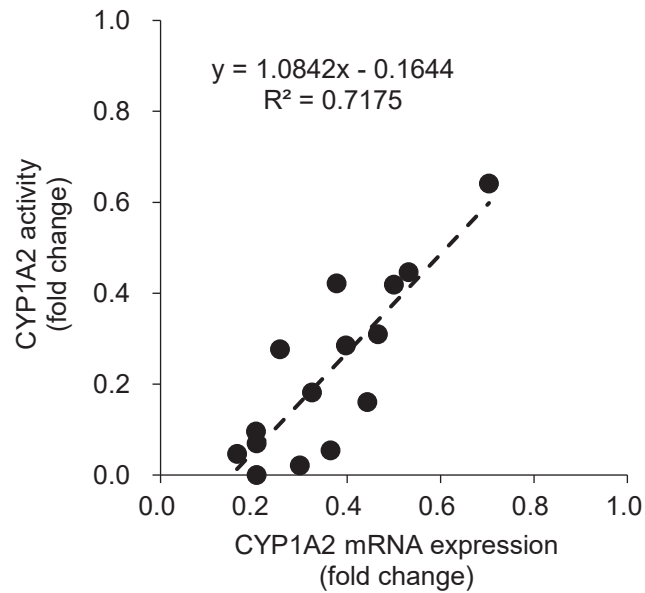


Fig. 5. Individual data of Fig. 4. (A) Fold change in CYP1A2 mRNA expression compared to vehicle-treated control (0.1% DMSO) after 48 h of incubation. (B) phenacetin *O*-deethylation as a measure of CYP1A2 activity after 72 h of incubation.

Fig. 4に示した各肝細胞ロットにおけるオベチコール酸曝露48時間後のCYP1A2 mRNA発現変動と曝露72時間後のCYP1A2代謝活性変動の各個体値をプロットしたところ、正の相関が認められた (Fig. 6A、 $r^2=0.7175$)。また、100 μM オベチコール酸がプレインキュベーション存在下でCYP1A2を阻害したことを考慮して各肝細胞ロットにおける100 μM オベチコール酸の個体値を除いたところ、 r^2 値は0.8520に増加した (Fig. 6B)。

A



B

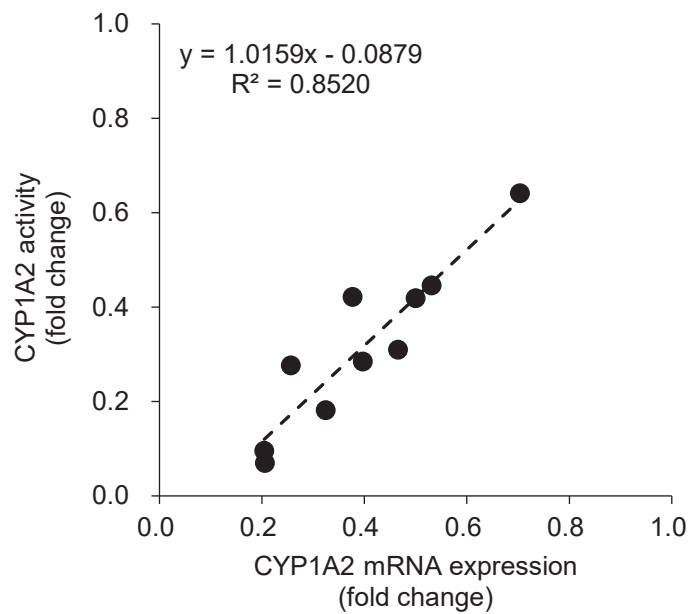


Fig. 6. Correlation between decreases in CYP1A2 mRNA expression and decreases in CYP1A2 activity. (A) Individual data of Fig.4A and individual data of Fig.4B. (B) As for (A) with the points corresponding to 100 μM OCA excluded.

第四節 オベチコール酸曝露による細胞死への影響

24wellコラーゲンプレートに播種した5ドナーのヒト凍結接着肝細胞にオベチコール酸を曝露した際の72時間後の細胞死について、肝細胞培地中におけるlactate dehydrogenase (LDH) を測定するLDHアッセイを用いて評価した。0.1% DMSOを72時間曝露したサンプルを可溶化した場合の培地中LDHを100%とした。その結果、有意な増加は認められなかった (Fig. 7)。

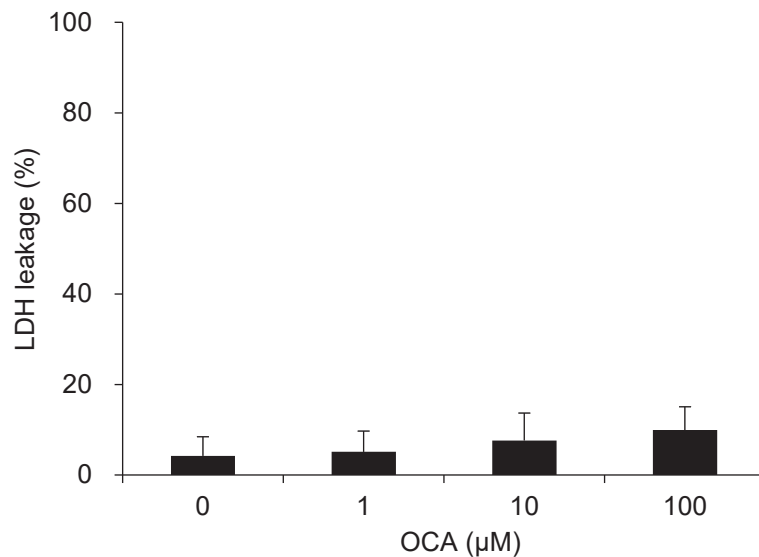


Fig. 7. Extent of leakage of lactate dehydrogenase into the cell culture medium compared to lysed untreated cells (100% cytotoxicity) after incubation for 72 h with OCA. Mean + S.D. of preparations of hepatocytes from five donors.

小括

オベチコール酸の CYP1A2 に対する影響として、まずオベチコール酸の CYP1A2 阻害能および CYP1A2 ダウンレギュレーション能を評価した。オベチコール酸の CYP1A2 阻害能評価においては、オベチコール酸はプレインキュベーションの有無に関わらず、10 μM までは CYP1A2 を阻害しないことを確認した (Fig. 3)。100 μM オベチコール酸はプレインキュベーション実施下でのみ阻害が認められたことから、オベチコール酸は 100 μM のような高濃度条件下では時間依存的阻害を起こすポテンシャルがあることが示唆された。ラット *in vivo* におけるオベチコール酸のマスバランス試験では、オベチコール酸の酸化代謝物として、3 位がケト基に変換された 3-オキシ体が報告されていたが、大腸および糞中でのみ認められ曝露量は 3% までと少なく、かつ肝臓中および血漿中では認められなかった (Roda *et al.*, 2017)。よって、3-オキシオベチコール酸は *in vitro* 試験条件下では生成するものの、ヒト *in vivo* で肝臓中 CYP1A2 に与える影響は低いと考えられる。

次に、オベチコール酸の CYP1A2 ダウンレギュレーション惹起能を評価するため、24well コラーゲンプレートに播種した 5 ドナーのヒト凍結接着肝細胞にオベチコール酸を曝露し、48 時間後の CYP1A2 mRNA 発現変動および 72 時間後の CYP1A2 代謝活性変動を評価することで、オベチコール酸のヒト凍結接着肝細胞に発現する CYP1A2 への影響を検討した。その結果、オベチコール酸は *in vitro* で CYP1A2 を mRNA 発現、代謝活性の両方を有意に低下させることが確認された (Fig. 4)。使用した 5 つの肝細胞ロットのすべてにおいて概ね同様の傾向が認められ、各ドナー間で CYP1A2 の発現量には差があると考えられるが、オベチコール酸に対する反応性は同様の傾向があることが確認された (Fig. 5)。

各肝細胞ロットにおけるオベチコール酸曝露 48 時間後の CYP1A2 mRNA 発現変動と曝露 72 時間後の CYP1A2 代謝活性変動をプロットしたところ、正の相関が認められた (Fig. 6A) ことから、CYP1A2 の mRNA 発現低下が CYP1A2 の代謝活性低下に反映されていること、ヒト肝細胞で認められた CYP1A2 の代謝活性低下には CYP1A2 の酵素阻害の影響の寄与は低いことが示唆された。100 μM オベチコール酸を曝露したサンプルの個体値を除いたところ、 r^2 値は各 0.8520 に増加した (Fig. 6B) こと、そしてオベチコール酸の CYP1A2 阻害能評価より 100 μM オベチコール酸が時間依存的阻害を起こすポテンシャルがある (Fig. 4B) ことから、100 μM のような高濃度条件下ではオベチコール酸の CYP1A2 酵素阻害の影響も CYP1A2 活性低下に寄与している可能性が考えられる。また、オベチコール酸曝露による有意な細胞死増加はすべての濃度において認められなかった (Fig. 7) ことより、細胞毒性による mRNA 発現変動や代謝活性変動は起きていないと考えられる。

In vitro CYP ダウンレギュレーション評価は酵素誘導と同様、ヒト *in vivo* 肝臓中濃度を反映した評価濃度を設定することが望ましいと考えられる。本研究は 1 μM および 10 μM オベチコール酸 (非結合型と結合型を合計した総濃度) が CYP1A2 ダウンレギュレーションを惹起した。オベチコール酸とカフェインの臨床 DDI 試験 (Edwards *et al.*, 2017) におけるオベチコール酸のヒト血漿中濃度は報告されていない。第一相試験などの臨床試験で得られた血漿中濃度を基にモデルを構

築する母集団薬物動態解析により得られたモデルにおける、10 mg 単回投与時の予想ヒト血漿中総濃度（非結合型濃度と結合型濃度を合計した濃度）は C_{max} で 99.5 ng/mL、ヒト予測肝臓中総濃度は C_{max} で 2395 ng/mL（オベチコール酸の分子量を 420.62 としたとき、5.69 μ M）と報告されている（Edwards *et al.*, 2016; Galetin *et al.*, 2017）。よって、カフェインとオベチコール酸の臨床 DDI 試験における 25 mg オベチコール酸を反復投与した際の肝臓中総濃度（ C_{max} ）はで数 μ M から数十 μ M であると予想される。よって、本研究における *in vitro* 評価系で CYP1A2 ダウンレギュレーションが認められた試験濃度と *in vivo* 予測肝臓中濃度には大きな乖離は認められないと考えられた。なお、日本の DDI ガイドラインでは、ヒト臨床試験で被験者の肝臓組織を採取し正確なヒト肝臓中濃度を算出することは侵襲性が高いため難しいことから、ヒト肝臓中濃度の代替として血漿タンパク質と結合していない（非結合型）ヒト血漿中 C_{max} の 50 倍を含む設定濃度で酵素誘導評価を実施することとされている。本研究においてもヒト血漿および各 *in vitro* 評価系におけるオベチコール酸のタンパク結合率を算出することで非結合型濃度での濃度設定評価ができると期待され、今後の課題である。

In vitro の肝細胞培養系について、肝細胞は播種直後からその代謝酵素活性が急速に減少することが知られている。そのため、肝細胞播種後にマトリゲル等の細胞外マトリックスを重層したり、格子状になった特殊なプレート上に肝細胞を播種したりすることで肝細胞同士を凝集させて生体内の細胞間コミュニケーションを模倣する三次元培養系や、培養液の循環により絶えず肝細胞へ新鮮な培地を供給する灌流培養系などが考案され、長期培養に適応可能であることが報告されている（Arakawa *et al.*, 2017; Dash *et al.*, 2009）。三次元培養を行うことで細胞に極性が生じ、胆管様構造ができるなどの変化が生じることも報告されており、使用する培養系の特徴や培養期間によって代謝酵素や核内受容体の発現はそれぞれ異なると考えられる。Dash らは灌流培養系に 0.5 および 10 μ M オベチコール酸を 48 時間曝露した後のヒト肝細胞の RNA-sequence analysis を実施することで、オベチコール酸がヒト肝細胞に与える影響を評価している（Dash *et al.*, 2017）。0.5 および 10 μ M で濃度依存性はないものの CYP1A2 mRNA は低下しており、*in vitro* 酵素誘導評価系で汎用される 24well コラーゲンプレートに単層培養したヒト肝細胞を用いて評価した本研究結果を支持する結果となった。よって、少なくとも異なる 2 つの *in vitro* 培養系において、オベチコール酸がヒト凍結接着肝細胞の CYP1A2 mRNA を低下することが確認された。

以上より、ヒト凍結接着肝細胞を用いた *in vitro* 評価系において、オベチコール酸は細胞死を起こさない濃度で CYP1A2 ダウンレギュレーションを惹起すると考えられた。

第二章 オベチコール酸のCYP2B6及びCYP3A4 に対する影響

第一節 序論

CYP1A2を含め、医薬品によるCYPダウンレギュレーションは報告例が少なくそのメカニズムはほとんど解明されていないが、酵素誘導に関しては代表的なポジティブコントロールとなる物質やその転写制御メカニズムに関する検討が多くなされてきた (Pelkonen *et al.*, 2008)。CYPの転写因子は主に核内受容体によって制御されており、リガンド非結合下にある核内受容体はリプレッサータンパク質と複合体を形成して、細胞質に存在している。リガンドが結合すると、複合体が解離して活性化し、核内移行する。核内移行した核内受容体は、別の転写調節因子とヘテロ二量体を形成し、応答領域に結合することで種々の遺伝子の酵素誘導を引き起こす。CYP1A2はaryl hydrocarbon receptor (AhR) によって、CYP2B6やCYP3A4はconstitutive androstane receptor (CAR) およびpregnane X receptor (PXR) によって酵素誘導されることが知られている。薬物代謝を担っている主要な分子種であり、それぞれ制御する核内受容体が異なることから、医薬品開発における酵素誘導評価では、CYP1A2、CYP2B6およびCYP3A4の評価が必須となっている。

そこで本章では、24wellコラーゲンプレートに播種した5ドナーのヒト凍結接着肝細胞にオベチコール酸を曝露し、48時間後のCYP2B6およびCYP3A4 mRNA発現変動および72時間後のCYP2B6およびCYP3A4代謝活性変動を評価することで、酵素誘導評価に必須となっているCYP1A2以外の分子種であるCYP2B6やCYP3A4に対するオベチコール酸の影響を検討した。

第二節 オベチコール酸がヒト凍結接着肝細胞のCYP2B6 mRNA、代謝活性に及ぼす影響

オベチコール酸がヒト凍結接着肝細胞の CYP2B6 mRNA、代謝活性に及ぼす影響について、第一章、第三節と同様に評価した。48 時間曝露後の CYP2B6 mRNA 発現変動を real-time PCR により、72 時間曝露後の CYP2B6 代謝活性を CYP2B6 典型基質ブプロピオンの代謝物ヒドロキシブプロピオンの培地中濃度を LC-MS/MS で測定することにより評価した。その結果、オベチコール酸によって CYP2B6 の mRNA 発現は有意ではないが濃度依存的に増加した (Fig. 8A) 。一方で、代謝活性については、すべての濃度で変動は認められなかった (Fig. 8B)。また、使用した 5 つの肝細胞ロットの個体値を参照したところ、mRNA 発現は 2 ロットで濃度依存的な増加傾向にあったが (Fig.9A)、代謝活性には一定の傾向は認められなかった (Fig. 9B)。

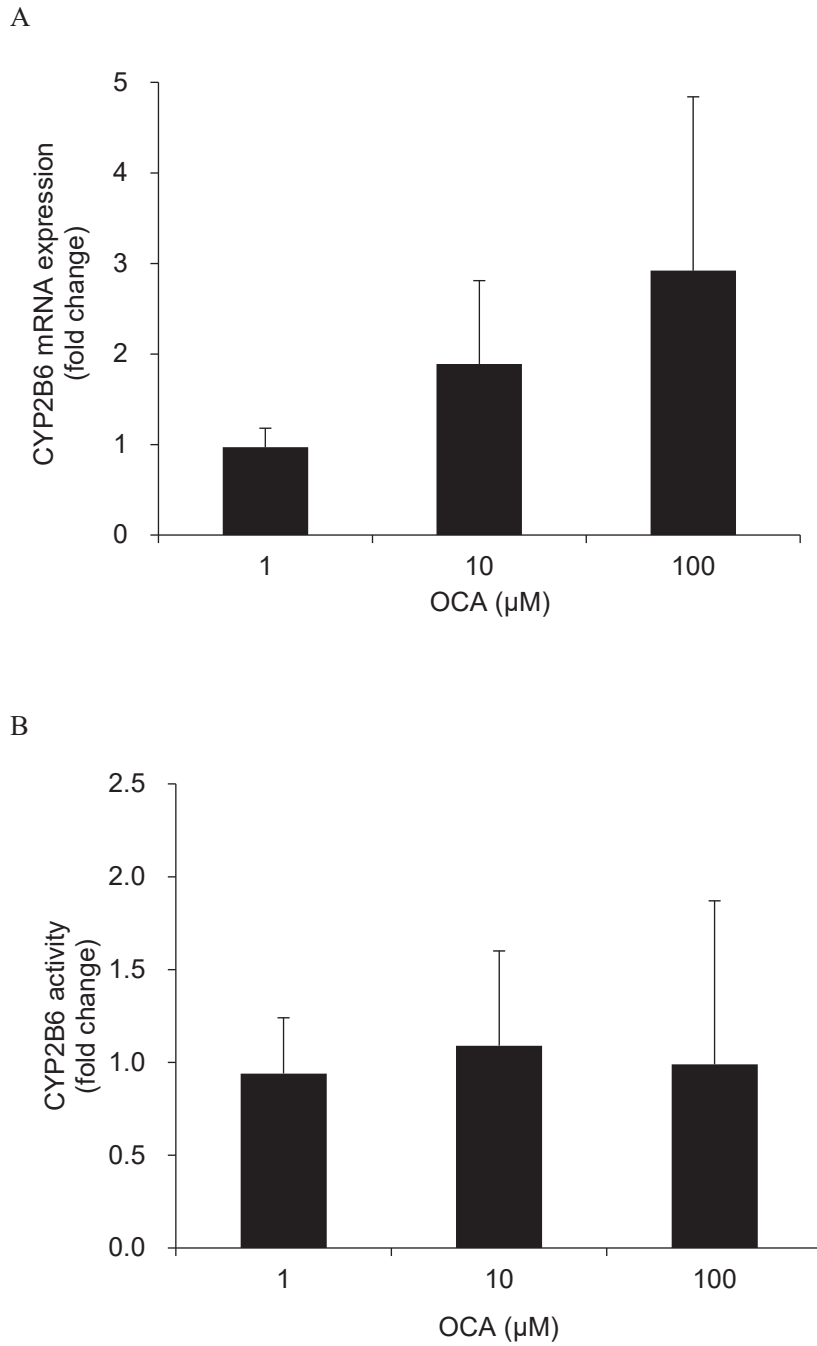


Fig. 8. Effect of OCA on mRNA levels and enzyme activity of CYP2B6. (A) Fold change in mRNA expression of CYP2B6 compared to vehicle-treated control (0.1% DMSO) after 48 h of incubation. (B) Bupropion hydroxylation was used as a measure of CYP2B6 activity after 72 h of incubation. Mean + S.D. of preparations of hepatocytes from five donors.

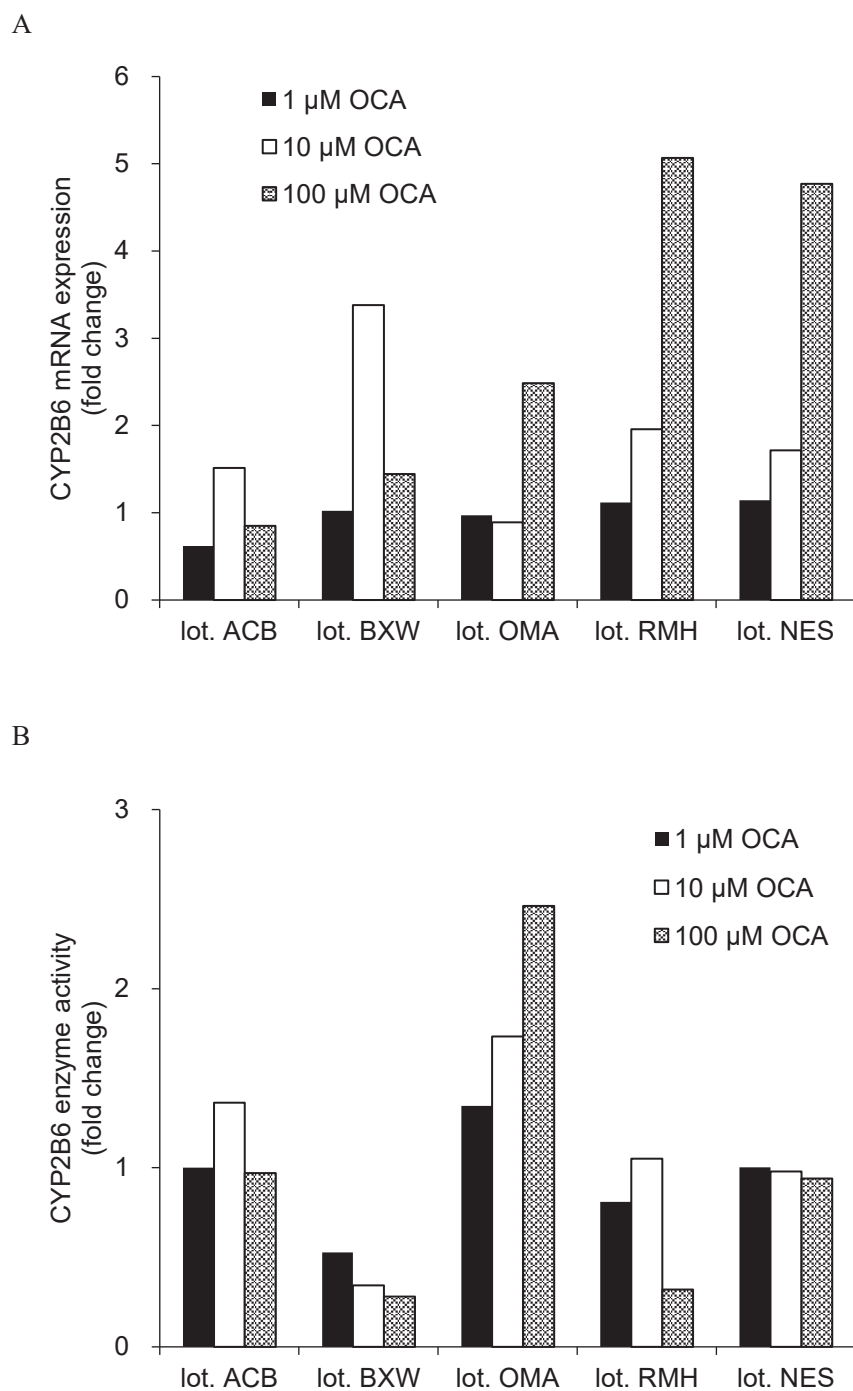
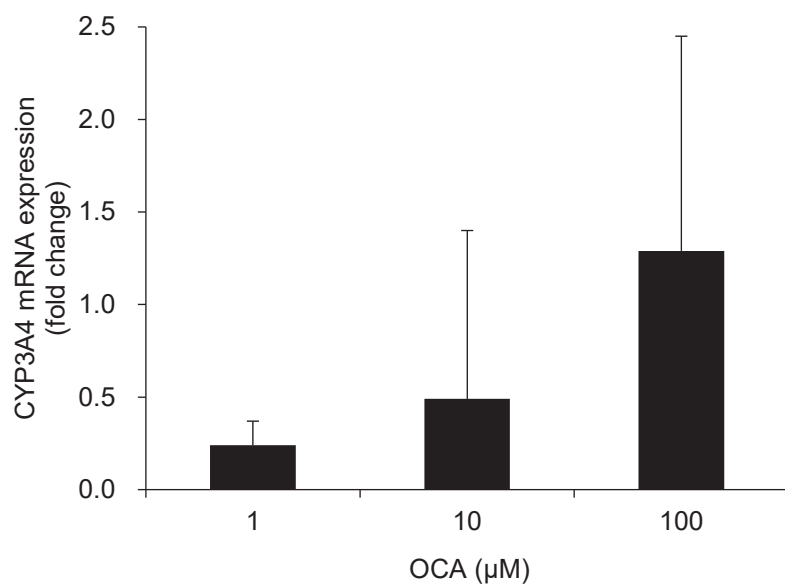


Fig 9. Individual data of Fig. 8. (A) Fold change in mRNA expression of CYP2B6 compared to vehicle-treated control (0.1% DMSO) after 48 h of incubation. (B) Bupropion hydroxylation was used as a measure of CYP2B6 activity after 72 h of incubation.

第三節 オベチコール酸がヒト凍結接着肝細胞のCYP3A4 mRNA、代謝活性に及ぼす影響

オベチコール酸がヒト凍結接着肝細胞の CYP3A4 mRNA、代謝活性に及ぼす影響について、第一章、第三節と同様に評価した。48 時間曝露後の CYP3A4 mRNA 発現変動を real-time PCR により、72 時間曝露後の CYP3A4 代謝活性を CYP13A4 典型基質ミダゾラムの代謝物 1'-ヒドロキシミダゾラムの培地中濃度を LC-MS/MS で測定することにより評価した。その結果、オベチコール酸によって、CYP3A4 の mRNA 発現は、有意ではないが 1 μ M で 50%以下に低下した後、10 μ M および 100 μ M にかけて増大する傾向が認められた (Fig. 10A)。一方で、代謝活性については、実施したすべての濃度で有意な低下が認められた (Fig. 10B)。また、使用した 5 つの肝細胞ロットの個体値についても、全てのロットについて概ね同様の傾向が認められた (Fig. 11)。

A



B

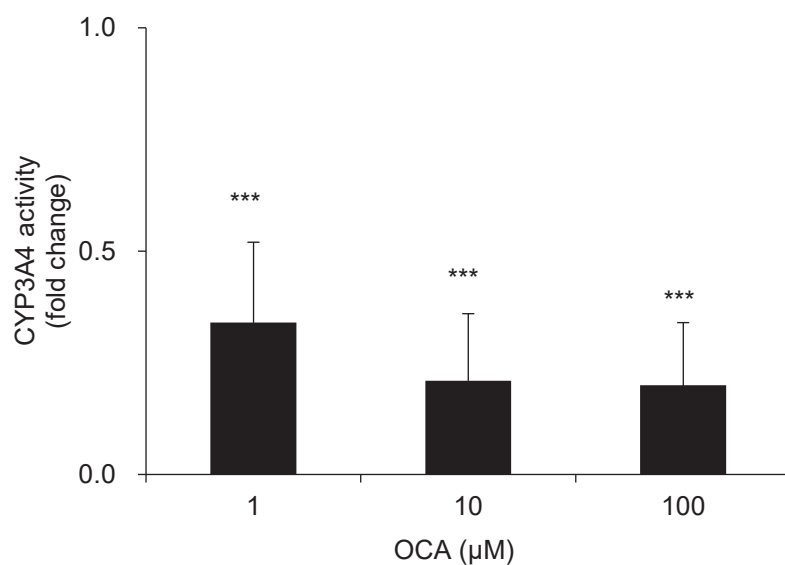
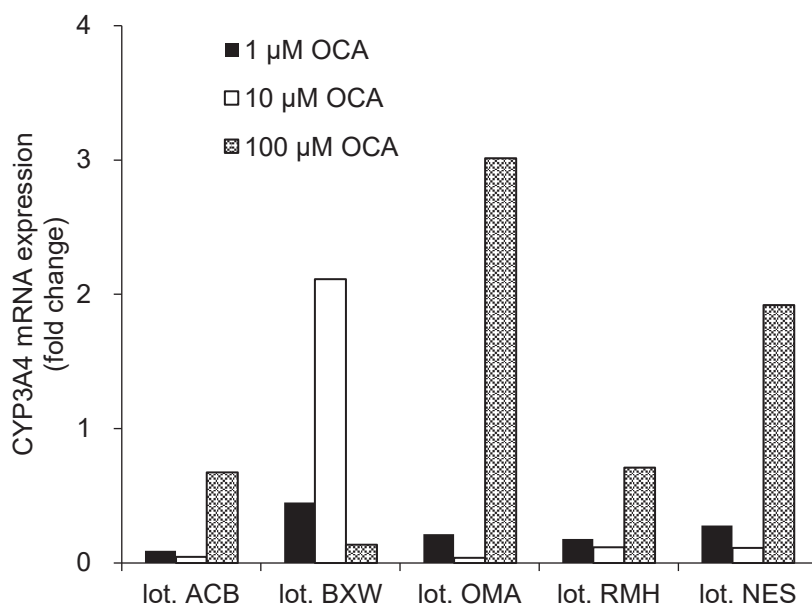


Fig. 10. Effect of OCA on mRNA levels and enzyme activity of CYP3A4. (A) Fold change in mRNA expression of CYP3A4 compared to vehicle-treated control (0.1% DMSO) after 48 h of incubation. (B) Midazolam hydroxylation as a measure of CYP3A4 activity after 72 h of incubation. Mean + S.D. of preparations of hepatocytes from five donors; * $p < 0.001$ versus control (0.1% DMSO).**

A



B

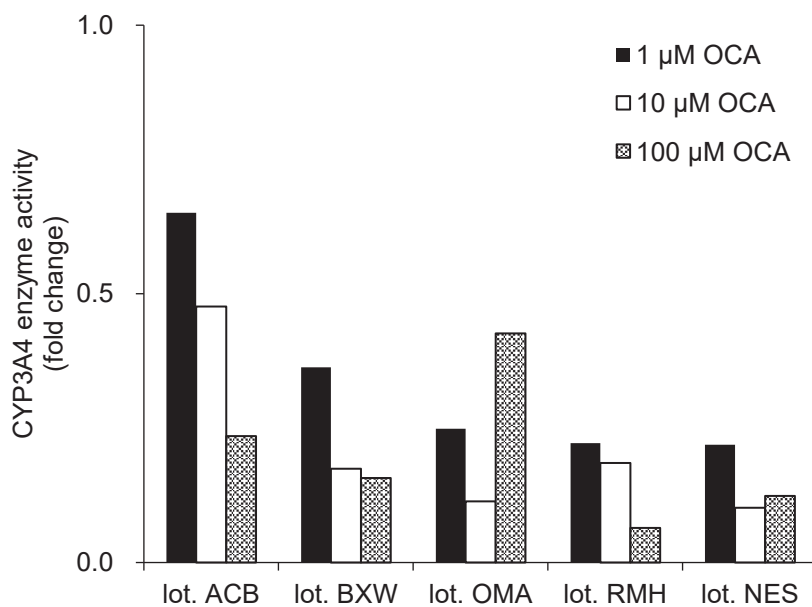


Fig. 11. Individual data of Fig. 10. (A) Fold change in mRNA expression of CYP3A4 compared to vehicle-treated control (0.1% DMSO) after 48 h of incubation. (B) Midazolam hydroxylation as a measure of CYP3A4 activity after 72 h of incubation.

第四節 オベチコール酸のCYP3A4直接阻害能の評価

オベチコール酸がヒト凍結接着肝細胞の CYP3A4 代謝活性を実施したすべての濃度で有意に低下させたことから、オベチコール酸は CYP3A4 を阻害する可能性がある。そこで、NADPH 添加ヒト肝ミクロソームを用いて、オベチコール酸の CYP3A4 阻害能を評価した。その結果、100 μM においては、プレインキュベーションの有無に関わらず、阻害が認められた (Fig. 12)。

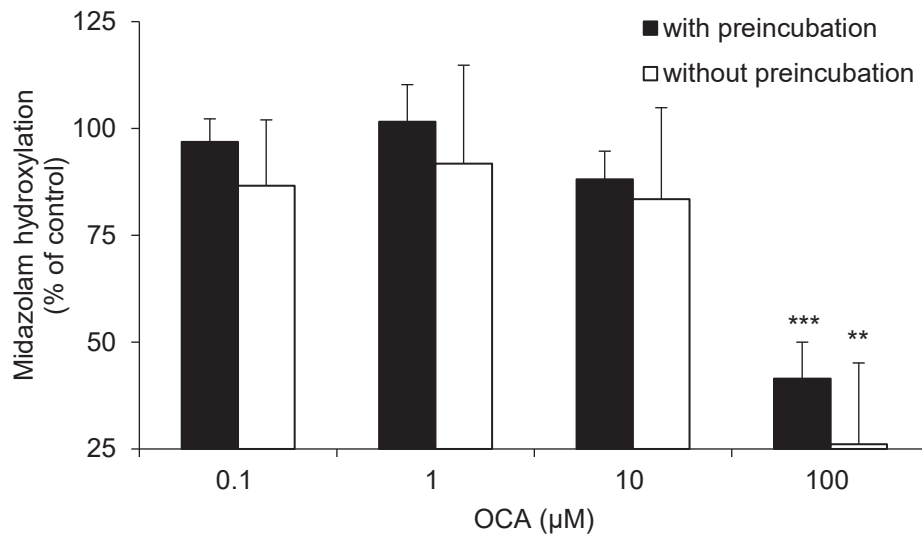


Fig. 12. Assessment of direct interaction of OCA with CYP3A4 in human liver microsomes. Midazolam hydroxylation as a measure of CYP3A4 activity in the presence of OCA with or without a 20-min preincubation with the OCA. Points represent percent metabolite formation compared to vehicle-treated control (0.1% DMSO); ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$ versus control (0.1% DMSO).**

小括

CYP1A2 以外の CYP 分子種として、各 DDI ガイドラインで定められている他の分子種である CYP2B6 や CYP3A4 に対するオベチコール酸による影響を評価した。CYP2B6 の mRNA 発現は、有意ではないがオベチコール酸濃度依存的に増加しており (Fig. 8A)、代謝活性はすべての濃度で大きな変動は認められなかったことから (Fig. 8B)、代謝活性には反映されていないものの、オベチコール酸が CYP2B6 の酵素誘導能を有する可能性が考えられた。一方で、CYP3A4 の mRNA 発現は、有意ではないが 1 μM で 50%以下に低下した後増大する傾向にあり (Fig. 10A)、代謝活性はすべての濃度において有意に低下した (Fig. 10B)。そこで、ヒト肝ミクロソームを用いた CYP3A4 の直接阻害能評価を実施したところ、オベチコール酸はプレインキュベーションの有無に関わらず、100 μM オベチコール酸による阻害が認められたことから (Fig. 12)、オベチコール酸は CYP3A4 の直接阻害能を有し、高濃度条件下ではヒト凍結接着肝細胞を用いた *in vitro* 評価における代謝活性低下に影響している可能性が考えられた。なお、Dash らは、前述した CYP1A2 と同様に 0.5 および 10 μM オベチコール酸を 48 時間曝露した後のヒト肝細胞の RNA-sequence analysis を実施することでオベチコール酸 (0.5 および 10 μM) の CYP3A4 に対する影響を検討しており (Dash *et al.*, 2017)、本研究と同様 mRNA 発現は実施濃度のうち、低濃度の 0.5 μM においてより低下していることが確認されていた。

オベチコール酸は、farnesoid X receptor (FXR) アゴニストとして開発された原発性胆汁性胆管炎治療剤である (Kowdley *et al.*, 2018; Pellicciari *et al.*, 2002)。FXR は生理的濃度の胆汁酸や胆汁酸生合成中間体が結合して活性化し、標的遺伝子の FXR 応答領域に結合し、転写を促進あるいは抑制する (Wang *et al.*, 1999)。FXR はコレステロールを胆汁酸またはステロイドホルモンに代謝する肝臓、小腸、腎臓、および腎に高発現し、胆汁酸およびコレステロールの恒常性の維持に寄与している。肝臓における胆汁酸濃度が高くなった場合、胆汁酸が FXR に結合し、SHP (small heterodimer partner) の発現が酵素誘導され、LRH-1 (liver receptor homologue-1) に結合して一次胆汁酸合成経路の最初の段階である律速酵素 CYP7A1 の発現を抑制する (Goodwin *et al.*, 2000)。サンドイッチ培養されたヒト肝細胞を用いた *in vitro* 系において、0.5 および 10 μM オベチコール酸が SHP mRNA 発現は増加し、CYP7A1 の mRNA 発現は低下した報告があることから、本評価系における曝露濃度および曝露時間においても、オベチコール酸は FXR アゴニストとして作用していると考えられる (Zhang *et al.*, 2017)。

オベチコール酸と同じく FXR アゴニストとして開発された低分子化合物の GW4064 について、ヒト凍結接着肝細胞の CYP3A4 mRNA および代謝活性に対する影響を検討した報告がある (Zhang *et al.*, 2015)。本報告では、FXR を活性化した結果、下流遺伝子である SHP mRNA 発現を増加させ、SHP が PXR、CAR を介する CYP3A4 のプロモーター領域の活性化を抑制することで、CYP3A4 の mRNA 発現を低下する可能性が示されていた。また、同報告において CYP2B6 mRNA 発現は低下せずむしろ増加する傾向が認められたため、CYP2B6 のレポーターアッセイをコントロール (単独条件) およびオベチコール酸の併用条件で実施しており、CYP2B6 プロモーター活性はオベチコール酸の併用により増大していることを確認している。以上より、CYP3A4 と CYP2B6 の転写

には、同じ核内受容体である PXR および CAR が関与しているものの、GW4064 による CYP3A4 と CYP2B6 の転写制御メカニズムは異なり、CYP2B6 は何らかのメカニズムによって活性化している可能性が示された。このような知見をふまえると、本研究で観察されたオベチコール酸による CYP3A4 の発現減少および CYP2B6 の発現増加についても、FXR を介して GW4064 と同様のメカニズムで惹起される可能性が考えられる。

FXR アゴニスト活性はオベチコール酸>GW4064>ケノデオキシコール酸（内因性の FXR アゴニスト）である（Fiorucci *et al.*, 2005）。オベチコール酸を用いた本研究では CYP3A4 mRNA 発現は有意ではないが、1 μM で低下した後 10 μM および 100 μM にかけて増大する傾向が認められた。その原因として（1）GW4064 を用いた報告（Zhang *et al.*, 2015）で提唱された FXR を介した CYP3A4 mRNA 発現低下メカニズムにフィードバック機構が存在する（2）GW4064 を用いた報告で CYP2B6 の転写が促進された（Zhang *et al.*, 2015）のと同様、FXR の刺激が増大すると CYP3A4 を直接転写活性化する可能性が考えられる。なお、GW4064 と CYP3A4 典型基質とのヒト *in vivo* での影響は、ヒト臨床薬物相互作用試験結果の報告例がないため現時点では不明である。

ヒト *in vivo* におけるオベチコール酸の CYP3A4 に対する影響について、オベチコール酸（1 日 1 回投与、10 または 25 mg の用量で 14 日間反復投与）と CYP3A4 の典型基質であるミダゾラム（2 mg）とのヒト臨床薬物相互作用試験（Edwards *et al.*, 2017）では、10 mg、25 mg オベチコール酸で C_{max} が 1.11 倍および 1.05 倍、 $\text{AUC}_{0-\infty}$ が 1.21 倍、1.32 倍と増大しており、*in vivo* においてもオベチコール酸によって CYP3A4 活性が低下していた。ヒト肝ミクロソームを用いた阻害試験では CYP1A2 よりも CYP3A4 の IC_{50} は低いと予想され（Fig. 12）、阻害による影響はより大きいと予想される。しかしながら、*in vivo* 試験での AUC 変化率が CYP1A2 基質のカフェインと比較して低く、本研究での *in vitro* 評価において CYP3A4 mRNA 発現は 10 μM 以上から増加する傾向も観察され、mRNA 発現変動と代謝活性変動には正の相関が認められなかった。したがって、オベチコール酸が CYP3A4 のダウンレギュレーションの検証化合物として適切かどうかは *in vitro* における 1 μM 以下の濃度域での検討や、より精確なヒト臨床薬物相互作用試験における *in vivo* 肝臓中濃度の予測などを通じて考慮していく必要がある。

第三章 オベチコール酸が酵素誘導下CYP1A2およびCYP1A2制御因子に及ぼす影響

第一節 序論

AhR は、ヒトのほとんどの臓器に発現し CYP1A2 の酵素誘導メカニズムにおいて重要な役割を担うリガンド依存性転写因子である。AhR は bHLH/PAS ファミリーに属する受容体で、リガンド非結合下では熱ショックタンパク質 90 (heat shock protein 90; HSP90) などと複合体を形成し、細胞質に存在している (Wilhelmsson *et al.*,1990)。酵素誘導物質が AhR に結合すると、AhR 複合体が構造変化して AhR は核内移行する。核内移行した AhR は同じ bHLH/PAS タンパク質の Arnt (AhR nuclear translocator) と複合体を形成したのち、CYP1A2 遺伝子のプロモーター上流に存在する XRE (xenobiotic responsive element) に結合して、転写活性化を行う。AhR と Arnt の複合体は CYP1A2 の XRE 以外にも、AhRR (aryl hydrocarbon receptor repressor: AhR 転写抑制因子) の XRE にも結合し転写活性化を行う。Arnt は核内に存在し、AhRR とヘテロ二量体を形成するため、AhRR が発現すると AhR による転写活性化は抑制され、AhR を介した酵素誘導には負のフィードバック機構が存在すると考えられている (Fig. 13)。

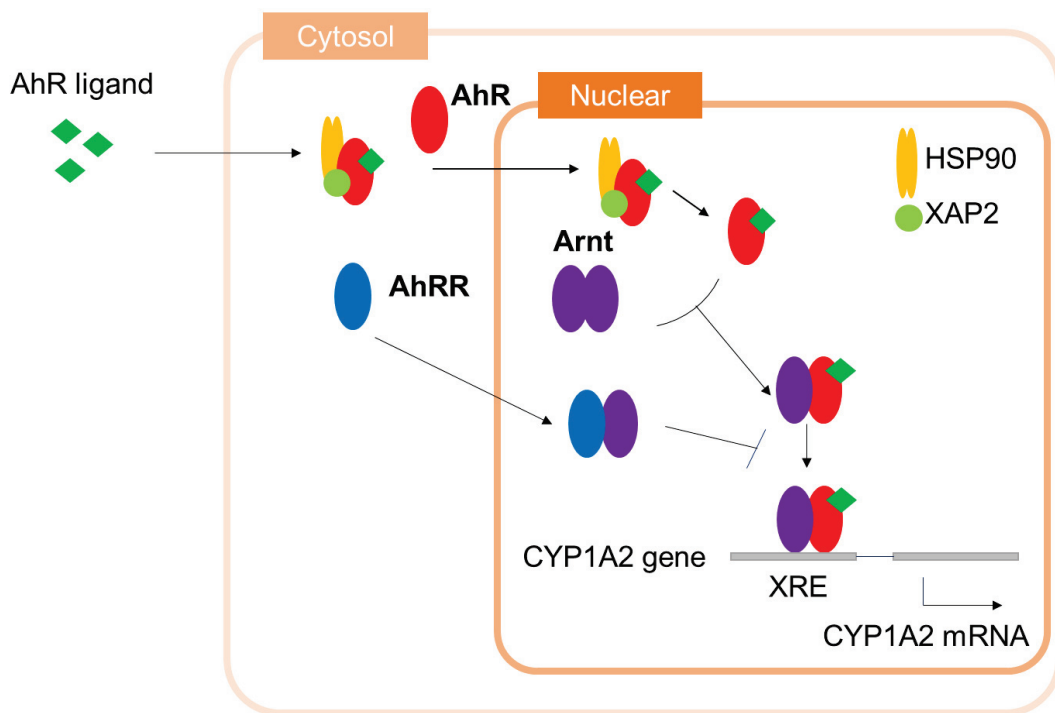


Fig. 13. Mechanism of CYP1A2 induction. (Klein *et al.*, 2010; partially modified)

AhR リガンドには環境化学物質として、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin (TCDD) や 3-MC などの多環式芳香族炭化水素類があり (Fig. 14)、直接 AhR に結合することで CYP1A2 を酵素誘導することが知られている。プロトンポンプ阻害薬オメプラゾールは多環式芳香族炭化水素構造を有しておらず (Fig. 14)、直接の AhR リガンドにはならないと考えられているが、AhR を活性化させ CYP1A2 を酵素誘導する医薬品として知られている (Yoshinari *et al.*, 2008)。そのため、オメプラゾールは医薬品開発における *in vitro* 酵素誘導試験 (CYP1A2 酵素誘導評価) のポジティブコントロールとして汎用されている。例えば、ランソプラゾールとならび、「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」における CYP1A2 の *in vitro* 酵素誘導薬に該当している。EMA の DDI ガイドラインにおいてもポジティブコントロールとして 50 μ M オメプラゾールを *in vitro* 酵素誘導試験で用いる旨が記載されている。

CYP ダウンレギュレーションのメカニズムが、既知の酵素誘導メカニズムに関連する転写因子等を介するのかは不明であるが、本章ではヒト凍結接着肝細胞を用いてオベチコール酸の酵素誘導下 CYP1A2 に対する影響や CYP1A2 の転写制御に関与する因子への影響を検討し、オベチコール酸の CYP1A2 ダウンレギュレーションのメカニズムを検討することを目的とした。

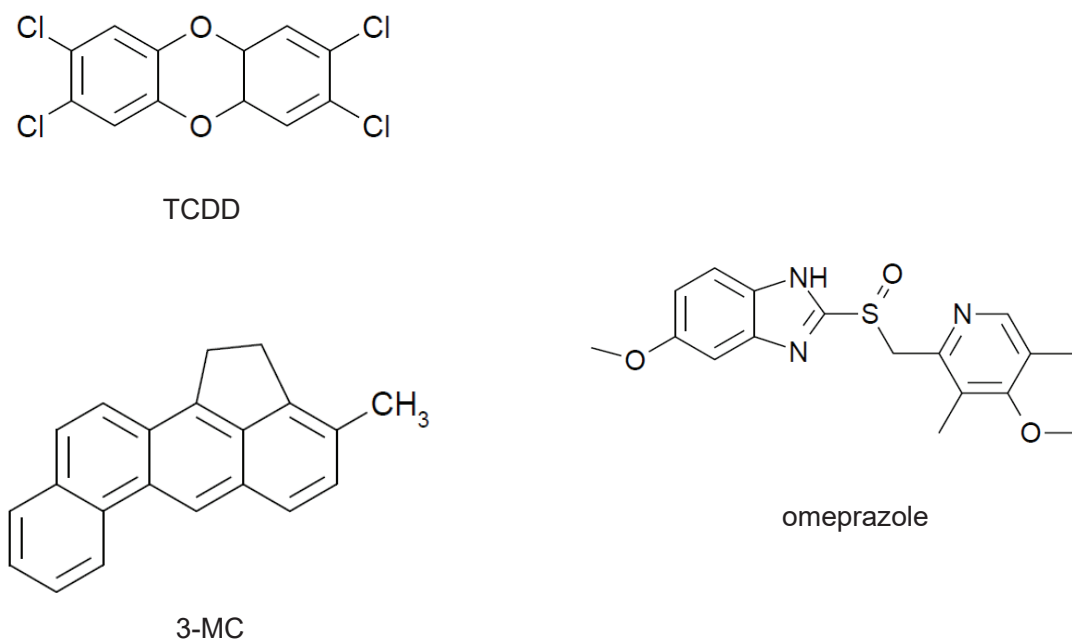


Fig. 14. Chemical structures of CYP1A inducers.

第二節 オベチコール酸がオメプラゾール酵素誘導下 CYP1A2 mRNA、代謝活性に及ぼす影響

オベチコール酸がオメプラゾールによって酵素誘導されたヒト凍結接着肝細胞の CYP1A2 mRNA、代謝活性に及ぼす影響について評価した。24well コラーゲンプレートに播種した 5 ドナーのヒト凍結接着肝細胞に、50 μ M オメプラゾールを単独、またはオベチコール酸 (1、10、100 μ M) と併用曝露した。48 時間後の CYP1A2 mRNA 発現を real-time PCR で評価し、72 時間後に CYP1A2 の典型基質であるフェナセチンの代謝試験を行い、代謝物であるアセトアミノフェンの培地中濃度を測定することで CYP1A2 代謝活性を評価した。その結果、オメプラゾール単独曝露によって、CYP1A2 mRNA 発現および代謝活性はそれぞれ 35 倍、20 倍程度に増大し酵素誘導傾向が認められ、さらにオベチコール酸との併用によって、酵素誘導された CYP1A2 mRNA および代謝活性はオベチコール酸の濃度依存的に低下した (Fig. 15)。また、使用した 5 つの肝細胞ロットの個体値について、全てのロットで概ね同様の傾向が認められた (Fig. 16)。

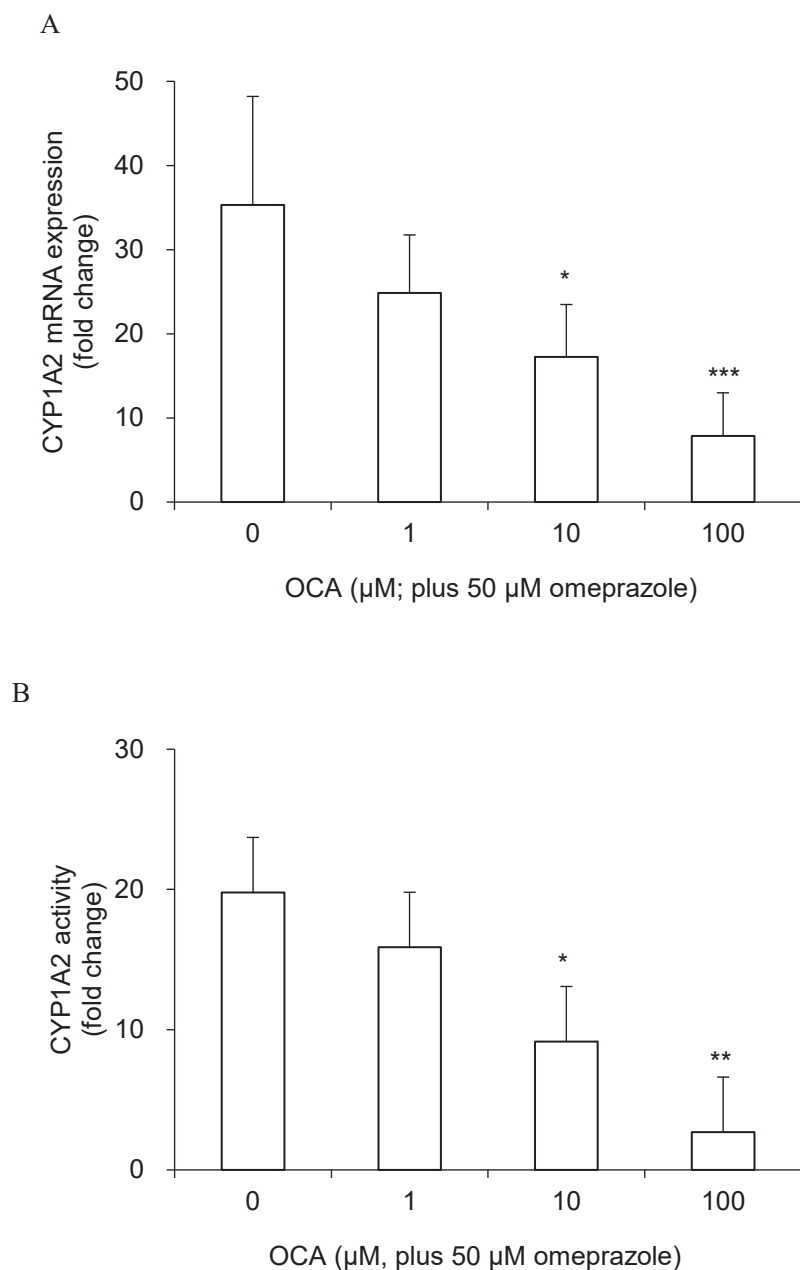
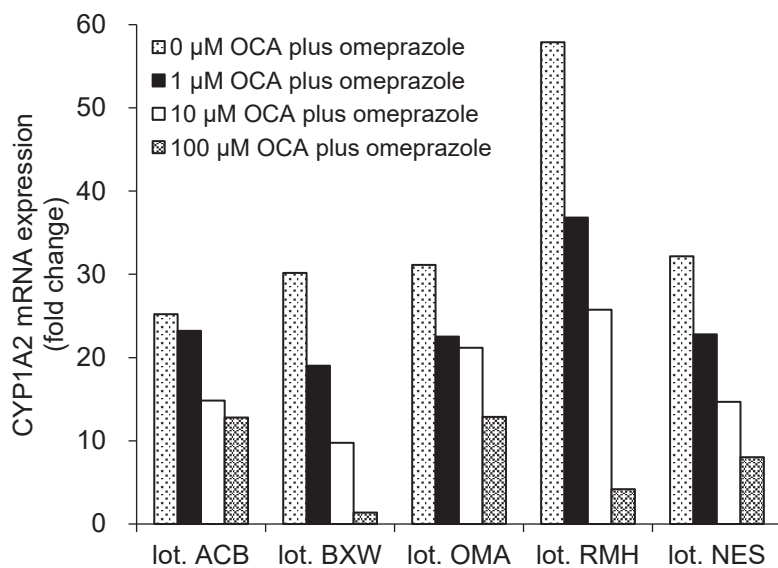


Fig. 15. Effect of OCA on induction of CYP1A2 by omeprazole in plated human hepatocytes. (A) Fold change in CYP1A2 mRNA expression compared to vehicle-treated control (0.1% DMSO) after 48 h of incubation. (B) Phenacetin *O*-deethylation as a measure of CYP1A2 activity after 72 h of incubation. Mean + S.D. of preparations of hepatocytes from five donors; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ versus control (50 μM omeprazole in 0.1% DMSO).

A



B

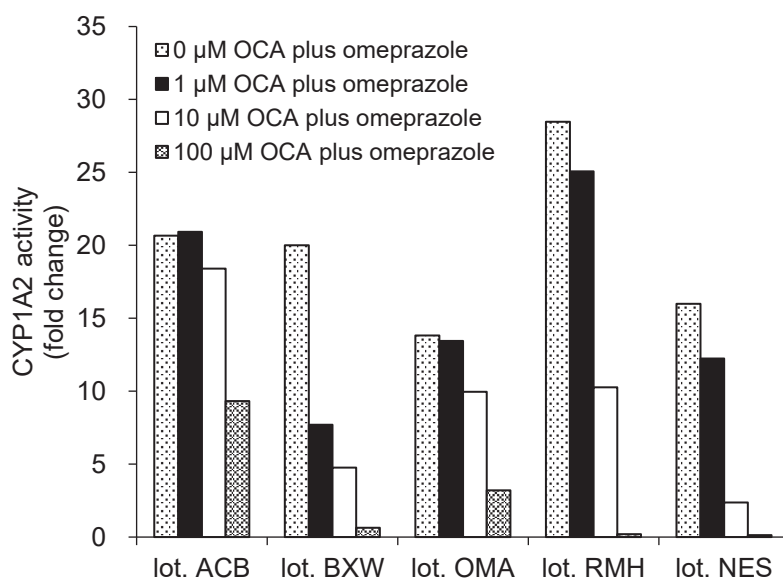


Fig. 16. Individual data of Fig. 15. (A) Fold change in CYP1A2 mRNA expression compared to vehicle-treated control (0.1% DMSO) after 48 h of incubation. (B) Phenacetin *O*-deethylation as a measure of CYP1A2 activity after 72 h of incubation.

第三節 オベチコール酸が CYP1A2 転写制御因子の mRNA に及ぼす影響

オベチコール酸がヒト凍結接着肝細胞の CYP1A2 転写制御因子である AhR、Arnt および AhRR mRNA に及ぼす影響について第一章、第二節と同様に評価した。オベチコール酸 (1、10、100 μM) を曝露し、48 時間後の AhR、Arnt および AhRR mRNA 発現を real-time PCR で評価した。その結果、AhR mRNA 発現変動はオベチコール酸によって有意に低下し、AhRR や Arnt については有意な変化は認められなかった (Fig. 17)。

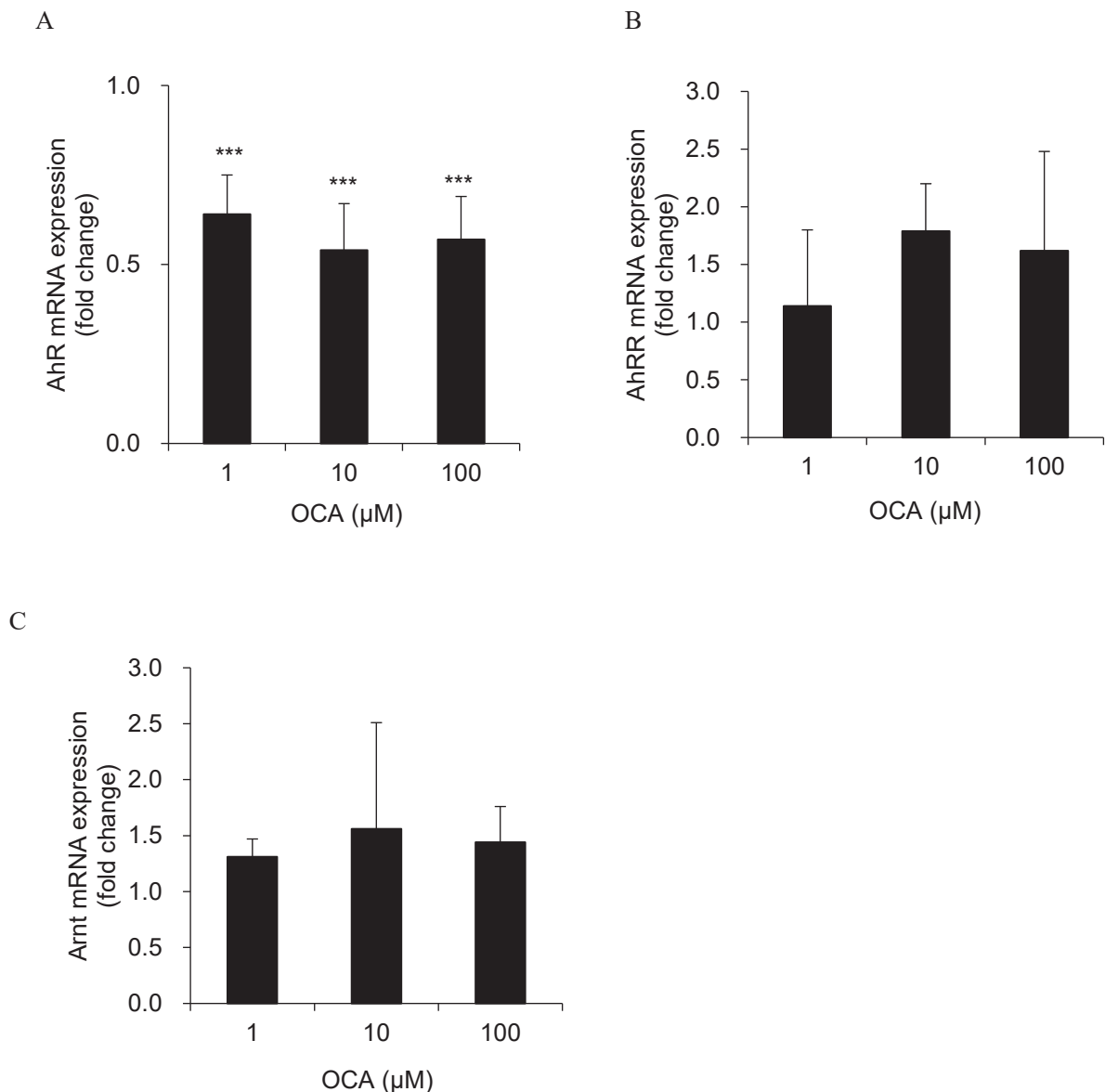


Fig. 17. Effect of OCA on mRNA expression of hepatocyte factors that regulate CYP1A2. Fold change in (A) AhR, (B) Arnt, and (C) AhRR mRNA expression compared to vehicle-treated control (0.1% DMSO) after 48 h of incubation. Mean + S.D. of preparations of hepatocytes from five donors; * $p < 0.001$ versus control (0.1% DMSO).**

小括

オベチコール酸による酵素誘導下 CYP1A2 に対する影響および CYP1A2 の転写制御に関与する因子への影響を検討した。オベチコール酸は、オメプラゾールで酵素誘導された CYP1A2 の mRNA 発現および代謝活性においても濃度依存的に低下させた。オベチコール酸を単独曝露した際と比較して、より明確にオベチコール酸の濃度依存的な変化を検出できた (Fig. 15)。なお、オベチコール酸単独曝露時と同様に、オメプラゾール併用時にも使用した 5 つの肝細胞ロットのすべてにおいて概ね同様の傾向が認められ、オベチコール酸に対する反応性は同様の傾向があることが確認された (Fig. 16)。医薬品開発において医薬品候補化合物を用いた *in vitro* 酵素誘導試験を実施し、CYP1A2 ダウンレギュレーションが疑われた場合に、評価方法のひとつとしてオメプラゾールを併用曝露することによって追加検討することができると期待される。

オベチコール酸がヒト凍結接着肝細胞の CYP1A2 転写制御因子である AhR、Arnt および AhRR mRNA に対する影響について評価した結果、AhR mRNA 発現変動はオベチコール酸によって有意に低下した (Fig. 17)。よって、AhR 発現減少がオベチコール酸の CYP1A2 ダウンレギュレーションのメカニズムのひとつである可能性が示唆された。有意な変化は認められなかったものの、AhRR においては増加する傾向は認められたことから、オベチコール酸が AhR mRNA 発現を減少させるとともに、AhRR mRNA 発現も増大させることで CYP1A2 の転写を抑制しているかもしれない。

オベチコール酸による AhR mRNA 発現減少メカニズムについては今後の検討が必要であるが、SHP をノックアウトさせたマウスを用いた研究において、SHP は AhR 発現を減少させる報告があることから (Kim *et al.*, 2018)、オベチコール酸が FXR を刺激し SHP を活性化した結果、AhR mRNA 発現が減少した可能性が考えられる。

本研究では細胞全体における AhR mRNA 発現を CYP1A2 mRNA と同じ 48 時間点で評価した。転写制御因子である AhR の mRNA 発現減少により、AhR タンパク質が減少することで CYP1A2 遺伝子の転写活性化に影響がでるまでにはタイムラグが生じると考えられることから、より短時間のオベチコール酸曝露における AhR 発現評価や、核画分の AhR 発現やプロモーターへの結合を検討し機能する AhR を評価することで、より詳細なメカニズムが検討できると期待される。

総論

本研究では、CYP1A2 の典型基質であるカフェインと原発性胆汁性胆管炎治療剤であるオベチコール酸との臨床薬物相互作用試験結果に着目した。同報告における 25 mg オベチコール併用下でのカフェインの $AUC_{0-\infty}$ の変動幅は 1.65 倍程度であり (Edwards *et al.*, 2017)、実臨床で被相互作用薬 (CYP1A2 で代謝される医薬品) に与える影響は大きくないが、オベチコール酸が CYP1A2 ダウンレギュレーションのポテンシャルを有することを示唆しており、CYP ダウンレギュレーション評価系の構築という観点からは有用な報告であると考えた。そこで、オベチコール酸が CYP1A2 ダウンレギュレーションを惹起する可能性を考え、オベチコール酸がヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 評価において CYP1A2 ダウンレギュレーションを惹起するか精査することを目的とした。

各 DDI ガイダンスおよびガイドラインに記載された *in vitro* 酵素誘導試験方法を参照して、24well コラーゲンプレートに播種したヒト凍結接着肝細胞に、オベチコール酸を曝露し、48 時間後の CYP1A2 mRNA 発現変動および 72 時間後の CYP1A2 代謝活性変動を評価したところ、*in vitro* においてもオベチコール酸が細胞死に影響を与えない濃度において CYP1A2 ダウンレギュレーションを惹起することが示された。また、本研究ではドナー間差が多いことで知られているヒト肝細胞を用いているため、各 DDI ガイダンスおよびガイドラインにおける *in vitro* 酵素誘導試験で推奨されている 3 ロットよりも多い 5 ロットで評価することで、ドナー間差をより考慮したが、すべてのドナーにおいて CYP1A2 ダウンレギュレーション傾向を検出することができた。本研究よりオベチコール酸が *in vitro* で CYP1A2 ダウンレギュレーションを惹起し *in vivo* の知見を反映していたことを確認できたことから、CYP1A2 のダウンレギュレーションの検証化合物として、メカニズム検討や評価系の構築に利用できると考えられた。

Sager らはブプロピオンおよびその代謝物による CYP2D6 ダウンレギュレーションの *in vitro-in vivo* 外挿性について、DDI ガイドライン・ガイダンスにおける酵素誘導評価で利用されている mechanism-based static pharmacokinetic (MSPK) モデル (Eq. 1) の一部の符号を変更することで評価している (Sager *et al.*, 2017)。MSPK モデルは阻害剤の体内濃度変化を考慮せず、常に一定の阻害剤濃度 (C_{max}) を維持することを仮定し、被相互作用薬の代謝に対する変動対象の CYP の寄与率 (f_m)、*in vitro* 酵素誘導試験より得られる E_{max} (最大誘導作用) および EC_{50} (最大効果の 50% の効果をもたらす濃度)、 $[I]_h$ (阻害剤の *in vivo* 肝臓中非結合型濃度) より被相互作用薬の AUC 変動 (AUC ratio) を簡便に予測できる手法である。本研究ではタンパク結合率などを算出しておらず MSPK モデルに必要な全パラメータは得られてはいないが、CYP1A2 典型基質であるカフェインの代謝に対する CYP1A2 の f_m を 1、ヒト接着肝細胞を用いた *in vitro* 試験 (Fig. 4) よりほぼ 50% 程度まで CYP1A2 mRNA 発現が減少した $1 \mu M$ を EC_{50} とおき、CYP1A2 の阻害の影響がなく最も CYP1A2 mRNA 発現が変動した $10 \mu M$ における mRNA 発現変動 ($1-10 \mu M$ 時の fold induction) を E_{max} (0.73) とし、10 mg オベチコール酸を単回投与した際のヒト予測肝臓中総濃度である 2395 ng/mL (オベチコール酸の分子量を 420.62 としたとき、 $5.69 \mu M$; Edwards *et al.*, 2016) とすること

で 10 mg オベチコール酸投与時における CYP1A2 典型基質カフェインの AUC ratio を簡易的に算出したところ、 B_h は 0.38、AUC ratio は 2.64 倍と算出された。実際の臨床 DDI 試験 (Edwards *et al.*, 2017) で得られた AUC ratio の 1.42 倍よりは大きい結果となったが、MSPK モデルは阻害剤濃度を想定される最大濃度で一定と仮定することで偽陰性を避けた過大評価傾向にある評価手法であることから、この式は概ね有用であると考えられた。今後より精確なパラメータを取得した評価をオベチコール酸に限らず *in vivo* で CYP ダウンレギュレーションが認められた検証化合物で行い、*in vivo* 結果と照らし合わせることで、CYP ダウンレギュレーションの MSPK モデル評価における妥当なクライテリアが設定できることが期待される。

$$AUC\ ratio = \left[\frac{1}{B_h \times f_m + (1 - f_m)} \right]$$

$$B_h\ (induction) = 1 + \frac{E_{max} * [I]_h}{[I]_h + EC_{50}}$$

$$B_h\ (CYP\ downregulation) = 1 + \frac{E_{max} * [I]_h}{[I]_h + EC_{50}}$$

f_m : the fraction of intrinsic metabolic clearance of the substrate mediated by P450 affected by drugs causing CYP down-regulation relative to the whole metabolic clearance of the liver

$[I]_h$: the concentration of the investigational drug in the liver hepatocytes and intestinal enterocytes

E_{max} : maximum effect (induction or down-regulation)

EC_{50} : concentration that yields 50% of the maximum effect

Eq. 1 Formula of MSPK model (Partially modified).

本研究で用いたオベチコール酸を含め、*in vitro* および *in vivo* 両方において CYP ダウンレギュレーションを引き起こす検証化合物が増えれば、CYP ダウンレギュレーション評価について、ヒト *in vivo* 臨床薬物相互作用試験の必要性を判断するための *in vitro* 試験における基準値の設定などが可能になるかもしれない。なお、現時点においても薬物動態スクリーニングとして実施する *in vitro* 酵素誘導試験の CYP1A2 ダウンレギュレーションに対するポジティブコントロールとして使用した肝細胞ロット間の反応性の差や、施設間差を評価することに利用できるかと期待される。CYP1A2 ダウンレギュレーションのポジティブコントロールとして利用するにあたり、オベチコール酸が CYP1A2 を特異的にダウンレギュレートすることが理想的である。そこで本研究では、*in vitro* 酵素誘導試験における CYP1A2 以外で評価必須な分子種である CYP2B6 および CYP3A4 について検討したところ、mRNA 発現低下と CYP 代謝活性低下に相関が認められたのは CYP1A2 のみであることを確認できた。

オベチコール酸による CYP1A2 ダウンレギュレーションのメカニズム検討として、オベチコール酸のオメプラゾール酵素誘導下 CYP1A2 および CYP1A2 制御因子に対する影響を検討した。オ

ベチコール酸を単独曝露した際と比較して、より明確にオベチコール酸の濃度依存的に CYP1A2 ダウンレギュレーションを mRNA、代謝活性ともに検出できた。さらに、オベチコール酸によって、CYP1A2 制御因子のひとつである AhR の mRNA 発現が有意に減少することを確認した。CYP1A2 医薬品による CYP1A2 ダウンレギュレーションが疑われた場合には、評価方法のひとつとしてオメプラゾールを併用曝露することによって追加検討することができると期待される。またオメプラゾールは AhR リガンド構造を有しておらず具体的な作用点は明らかとなっていないものの AhR 核内移行を促進することから、検討化合物による AhR の核内移行阻害が評価する際にオメプラゾールと併用することで核内移行する AhR の全体量を増加させることは、オベチコール酸による CYP1A2 ダウンレギュレーションのメカニズム検討において有用であると期待される。

肝障害などにより生成する炎症性サイトカインは、分子種非特異的に CYP ダウンレギュレーションを惹起することが知られている (Uno *et al.*, 2006)。本研究では肝実質細胞を使用しており、免疫に関与する Kupffer 細胞は含まれていないため、炎症性サイトカインは少なくとも本研究におけるオベチコール酸による *in vitro* CYP1A2 ダウンレギュレーションのメカニズムには関与していないと考えられる。

オベチコール酸の薬理作用である FXR アゴニスト作用と CYP1A2 発現減少との関連について、内因性物質で最も強力な FXR アゴニストである 50 μ M ケノデオキシコール酸を 48 時間ヒト凍結接着肝細胞に曝露した際の薬物代謝酵素 mRNA 発現および miRNA 発現変動を網羅的に解析した報告があり、CYP1A2 mRNA 発現が 0.26 倍に、AhR 発現が 0.73 倍に有意に低下したことを報告している (Krattinger *et al.*, 2016)。さらに、ケノデオキシコール酸曝露によって発現変動した miRNA と胆汁酸によって制御される遺伝子の mRNA の相関解析も行っており、CYP1A2、CYP1A1 と強い相関がある miRNA として miR-1260 を挙げている。GW4064 などの他の FXR アゴニストによる CYP1A2 ダウンレギュレーションの検証や、FXR 刺激による AhR 発現、CYP1A2 転写活性への影響を評価することは、オベチコール酸の CYP1A2 ダウンレギュレーションメカニズムを検討するのに有効であると期待される。

本研究によりオベチコール酸を CYP1A2 ダウンレギュレーションの検証化合物としてメカニズム検討や評価系の構築に利用可能であると提示できたことは、医薬品開発における CYP ダウンレギュレーションに関する評価研究において有意義な情報になると考えられた。

実験方法

(1) 試薬

Toronto Research Chemicals

オベチコール酸, ヒドロキシブプロピオン

Cayman Chemical

オメプラゾール

Fujifilm Wako Pure Chemical Corp.

ミダゾラム, RIPA lysis buffer, solvents analytical grade (or a suitable alternative)

Nacalai Tesque

MgCl₂·6H₂O, reduced β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β-NADPH), trypan blue, general purpose reagents

Sigma-Aldrich

アセトアミノフェン, ブプロピオン, フェナセチン

Tokyo Chemical Industry

カフェイン

Ultrafine

1'-ヒドロキシミダゾラム

(2) CYP 阻害試験

ヒト肝ミクロソームは 200 ドナーをプールしたもの (XTreme 200 Mixed Gender Human Liver Microsomes (Sekisui XenoTech)) を使用した。

プレインキュベーションなし

ヒト肝ミクロソーム (最終濃度: 0.1 mg protein/mL)、β-NADPH (最終濃度: 1 mg/mL) を含む 250 μM EDTA-250 μM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 37°C で 5 分インキュベートした後、オベチコール酸 (最終濃度: 0.1–100 μM) および典型基質を同時添加し、35 分インキュベートした。典型基質には、CYP1A2 典型基質であるフェナセチン (最終濃度: 10 μM) または CYP3A4 典型基質であるミダゾラム (最終濃度: 5 μM) を使用した。反応後、内部標準物質としてカフェインを含有したアセトニトリルを等量添加し、反応を停止した (カフェイン最終濃度: 50 nM)。

プレインキュベーションあり

ヒト肝ミクロソーム (最終濃度: 0.1 mg protein/mL)、β-NADPH (最終濃度: 1 mg/mL) を含む 250 μM EDTA-250 μM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 37°C で 5 分インキュベートした後、オベチコール酸 (最終濃度: 0.1–100 μM) を添加し、20 分インキュベートした。そして、CYP1A2 典型基質であるフェナセチン (最終濃度: 10 μM) またはミダゾラム (CYP3A4 典型基質: 5 μM) を添加し、15 分インキュベートした。反応後、内部標準物質としてカフェインを含有したアセトニトリルを等量添加し、反応を停止した (カフェイン最終濃度: 50 nM)。

(3) 細胞培養

凍結ヒト凍結接着肝細胞 (BioIVT) を抗生物質 (Torpedo™ Antibiotic Mix : BioIVT) 含有の InVitroGRO™ CP Medium (BioIVT) に融解し、 0.7×10^6 cells/mL の密度で Collagen I Cellware 24 well plates (Corning) に播種し、CO₂ インキュベーター内で培養した (37°C、5%CO₂)。播種 2-4 時間後に Primary Hepatocyte Maintenance Supplements (Thermo Fisher Scientific) 含有 William's E Medium (以下、培地 : Sigma-Aldrich) で培地交換した後、次の日から実験に使用した。DMSO に溶解したオベチコール酸単独またはオベチコール酸およびオメプラゾールを 1/1000 の比率で添加した培地に交換することで曝露を開始し (オベチコール酸終濃度 : 1、10 および 100 μM、オメプラゾール終濃度 : 50 μM)、24 時間ごとに同様の添加培地でメディアウム交換を行うことで 48 時間または 72 時間曝露した。なお、コントロール群はオベチコール酸単独群には DMSO、オメプラゾール併用群にはオメプラゾール (終濃度 : 50 μM) とした。なお、使用したヒト凍結接着肝細胞のドナー情報は以下の通りである。

肝細胞ロット

Lot	ACB	OMA	BXW	RMH	NES
Age (years)	51	37	73	27	35
Gender	Male	Male	Female	Male	Male
Race	Caucasian	Caucasian	Caucasian	Caucasian	Caucasian
Smoker	No	Yes	No	Yes	Yes
Alcohol use	Yes	Yes	No	Yes	Unknown
Drug use	No	Yes	No	Yes	Yes
Cause of death	Head trauma / blunt injury	Anoxia	Cerebrovascular accident / stroke	Head trauma	Anoxia

(4) mRNA 発現評価

曝露 48 時間後のヒト凍結接着肝細胞の CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4、AhR、AhRR および Arnt の mRNA 発現は Real-time RT-PCR を用いて評価した。肝細胞の溶解、細胞溶解液からの Total RNA の抽出および cDNA の作製を SuperPrep™ II Cell Lysis & RT Kit (TOYOBO) を用いて添付の説明書に従って行った。Real-time RT-PCR には下記に示したプライマーを用いて、THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix (TOYOBO) を使用し添付の説明書に従って行った。使用した肝細胞 5 ロットそれぞれについて、DMSO を曝露したサンプルに対する相対 mRNA 発現量 (fold change) を算出した。

プライマー

TaqMan primer/probe set (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

CYP1A2 : Hs00167927_m1

CYP2B6 : Hs03044634_m1

CYP3A4 : Hs00604506_m1

AhR : Hs00169233_m1

AhRR : Hs01005075_m1

Arnt : Hs01121918_m1

GAPDH (内標として使用) : Hs02758991_g1

(5) 代謝活性評価

曝露 72 時間後のヒト凍結接着肝細胞を CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 の代謝活性評価に使用した。曝露後の肝細胞を William's E medium で一度培地交換し、フェナセチン (CYP1A2 典型基質 : 50 μ M)、ブプロピオン (CYP2B6 典型基質 : 50 μ M) または ミダゾラム (CYP3A4 典型基質 : 5 μ M) を含有した William's E medium で培地交換後、CO₂ インキュベーター内で 2 時間代謝反応を実施した (37°C、5%CO₂)。反応後、内部標準物質としてカフェインを含有したアセトニトリルを等量添加し、反応を停止した (カフェイン最終濃度 : 50 nM)。反応溶液中の代謝物濃度を測定し (CYP1A2, アセトアミノフェン; CYP2B6, ヒドロキシブプロピオン; CYP3A4, 1'-ヒドロキシミダゾラム)、代謝物濃度から使用した肝細胞 5 ロットそれぞれについて DMSO を曝露したサンプルに対する相対代謝活性 (fold change) を算出した。

(6) 分析

(2) CYP 阻害試験および (5) 代謝活性評価の反応停止溶液を遠心分離後、上清を filtered using 96-well 0.45- μ m filter plates でろ過した。ろ過した後の溶液を high performance liquid chromatography (HPLC) tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) で測定した。

LC-MS/MS

HPLC : Nexera HPLC system (Shimadzu)

MS : TQ5500 tandem mass spectrometer (Sciex)

分析カラム : InertSustain C18 column (2- μ m particle size; 2.1 mm i.d. \times 50 mm; GL Science)

分析条件

移動相 A : 0.1%ギ酸 移動相 B : アセトニトリル

流速 : 0.45 mL/min

グラジエント : A gradient was run from 30% to 70% solvent B in 2 min

カラム温度 : 40 度

モニターイオン:

アセトアミノフェン m/z 152 \rightarrow 110

ヒドロキシブプロピオン m/z 296 \rightarrow 238

1'-ヒドロキシミダゾラム m/z 342 \rightarrow 324

カフェイン m/z 195 \rightarrow 138

ソフト : Analyst 1.6.3 software (Sciex)

(7) 細胞毒性評価

細胞毒性は曝露 72 時間後のヒト凍結接着肝細胞を培養した培地中の lactate dehydrogenase (LDH) を Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (Indianapolis) を用いて測定することで評価した。薬物を曝露せずに同期間培養した肝細胞を RIPA buffer で溶解した際の培地中 LDH 量を細胞死 100% として、各サンプルの細胞死 (%) を評価した。

(8) 統計処理

SAS program SAS/STAT, version 8.2 (SAS Institute)を使用し、コントロールとオベチコール酸曝露サンプルの統計的有意差を Tukey's test で評価した。p value が 0.05 未満の場合、統計的に有意であるとした。

引用文献

Arakawa H, Kamioka H, Jomura T, Koyama S, Idota Y, Yano K, Kojima H, Ogihara T. Preliminary evaluation of three-dimensional primary human hepatocyte culture system for assay of drug-metabolizing enzyme-inducing potential. *Biol Pharm Bull.* 2017;40(7):967-974.

Dash A, Figler RA, Blackman BR, Marukian S, Collado MS, Lawson MJ, Hoang SA, Mackey AJ, Manka D, Cole BK, Feaver RE, Sanyal AJ, Wamhoff BR. Pharmacotoxicology of clinically-relevant concentrations of obeticholic acid in an organotypic human hepatocyte system. *Toxicol In Vitro.* 2017;39:93-103.

Dash A, Inman W, Hoffmaster K, Sevidal S, Kelly J, Obach RS, Griffith LG, Tannenbaum SR. Liver tissue engineering in the evaluation of drug safety. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009;5(10):1159-74.

Edwards JE, Eliot L, Parkinson A, Karan S, MacConell L. Assessment of pharmacokinetic interactions between obeticholic acid and caffeine, midazolam, warfarin, dextromethorphan, omeprazole, rosuvastatin, and digoxin in phase 1 studies in healthy subjects. *Adv Ther.* 2017;34(9):2120-2138.

Edwards JE, LaCerte C, Peyret T, Gosselin NH, Marier JF, Hofmann AF, Shapiro D. Modeling and experimental studies of obeticholic acid exposure and the impact of cirrhosis stage. *Clin Transl Sci.* 2016;27(3):379-84.

Fiorucci S, Clerici C, Antonelli E, Orlandi S, Goodwin B, Sadeghpour BM, Sabatino G, Russo G, Castellani D, Willson TM, Pruzanski M, Pellicciari R, Morelli A. Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid X receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;313(2):604-612.

Galetin A, Zhao P, Huang SM. Physiologically based pharmacokinetic modeling of drug transporters to facilitate individualized dose prediction. *J Pharm Sci.* 2017;106(9):2204-2208.

Gilbar PJ and Brodribb TR. Phenytoin and fluorouracil interaction. *Ann Pharmacother.* 2001;35(11):1367-70.

Goodwin B, Jones SA, R R Price, M A Watson, D D McKee, L B Moore, C Galardi, J G Wilson, M C Lewis, M E Roth, P R Maloney, T M Willson, S A Kliewer. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell.* 2000;6(3):517-526.

Hariparsad N, Ramsden D, Palamanda J, Dekeyser JG, Fahmi OA, Kenny JR, Einolf H, Mohutsky M, Pardon M, Siu YA, Chen L, Sinz M, Jones B, Walsky R, Dallas S, Balani SK, Zhang G, Buckley D, Tweedie D. Considerations from the IQ induction working group in response to drug-drug interaction guidance from

regulatory agencies: focus on downregulation, CYP2C induction, and CYP2B6 positive control. *Drug Metab Dispos.* 2017;45(10):1049-1059.

Harkitis P, Daskalopoulos EP, Malliou F, Lang MA, Marselos M, Fotopoulos A, Albucharali G, Konstandi M. Dopamine D2-Receptor antagonists down-regulate CYP1A1/2 and CYP1B1 in the rat liver. *J PLoS One.* 2015;10(10): e0128708.

Kawakami H, Ohtsuki S, Kamiie J, Suzuki T, Abe T, Terasaki T. Simultaneous absolute quantification of 11 cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes by liquid chromatography tandem mass spectrometry with in silico target peptide selection. *J Pharm Sci.* 2010;100(1):341-352.

Kim YC, Seok S, Byun S, Kong B, Zhang Y, Guo G, Xie W, Ma J, Kemper B, Kemper JK. AhR and SHP regulate phosphatidylcholine and S-adenosylmethionine levels in the one-carbon cycle. *Nat Commun.* 2018;9(1):540.

Klein K, Winter S, Turpeinen M, Schwab M, Zanger UM. Pathway-targeted pharmacogenomics of CYP1A2 in human liver. *Front Pharmacol.* 2010;1:129.

Kowdley KV, Luketic V, Chapman R, Hirschfield GM, Poupon R, Schramm C, Vincent C, Rust C, Parés A, Mason A, Marschall HU, Shapiro D, Adorini L, Sciacca C, Beecher-Jones T, Böhm O, Pencek R, Jones D, obeticholic acid PBC Monotherapy Study Group. A randomized trial of obeticholic acid monotherapy in patients with primary biliary cholangitis. *Hepatology.* 2018;67(5):1890-1902.

Krattinger R, Boström A, Lee SML, Thasler WE, Schiöth HB, Kullak-Ublick GA, Mwinyi J. Chenodeoxycholic acid significantly impacts the expression of miRNAs and genes involved in lipid, bile acid and drug metabolism in human hepatocytes. *Life Sci.* 2016;156:47-56.

Krausova L, Stejskalova L, Wang H, Vrzal R, Dvorak Z, Mani S, Pavek P. Metformin suppresses pregnane X receptor (PXR)-regulated transactivation of CYP3A4 gene. *Biochem Pharmacol.* 2011;82(11):1771-80.

Nosaka H, Nadai M, Kato M, Yasui K, Yoshizumi H, Miyoshi M, Ying LZ, Baba K, Takagi K, Hasegawa T. Effect of a newly developed ketolide antibiotic, telithromycin, on metabolism of theophylline and expression of cytochrome P450 in rats. *Life Sci.* 2016;79(1):50-6.

Pan X, Lee YK, Jeong H. Farnesoid X receptor agonist represses cytochrome P450 2D6 expression by upregulating small heterodimer partner. *Drug Metab Dispos.* 2015;43(7):1002-7.

Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol.* 2008;82(10):667-715.

Pellicciari R, Fiorucci S, Camaioni E, Clerici C, Costantino G, Maloney PR, Morelli A, Parks DJ, Willson TM. 6 α -Ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J Med Chem*. 2002;45(17):3569-3572.

Ramírez J, House LK, Karrison TG, Janisch LA, Turcich M, Salgia R, Ratain MJ, Sharma MR. Prolonged pharmacokinetic Interaction Between Capecitabine and a CYP2C9 Substrate, celecoxib. *J Clin Pharmacol* . 2019;59(12):1632-1640.

Richert L, Tuschl G, Abadie C, Blanchard N, Pekthong D, Manton G, Weber JC, Mueller SO. Use of mRNA expression to detect the induction of drug metabolising enzymes in rat and human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;235(1):86-96.

Roda A, Aldini R, Camborata C, Spinuzzi S, Franco P, Cont M, Errico AD, Vasuri F, Degiovanni A, Maroni L and Adorini L. Metabolic profile of obeticholic acid and endogenous bile acids in rats with decompensated liver cirrhosis. *Clin Transl Sci*. 2017;10:292–301.

Sager JE, Tripathy S, Price LSL, Nath A, Chang J, Stephenson-Famy A and Isoherranen N. In vitro to in vivo extrapolation of the complex drug-drug interaction of bupropion and its metabolites with CYP2D6; simultaneous reversible inhibition and CYP2D6 downregulation. *Biochem Pharmacol*. 2017;123:85-96.

Stevison F, Kosaka M, Kenny JR, Wong S, Hogarth C, Amory JK, Isoherranen N. Does in vitro cytochrome P450 downregulation translate to in vivo drug-drug interactions? preclinical and clinical studies with 13-cis-retinoic acid. *Clin Transl Sci*. 2019;12(4):350-360.

Uno JK, Kolek OI, Hines ER, Xu H, Timmermann BN, Kiela PR, Ghishan FK. The role of tumor necrosis factor α in down-regulation of osteoblast pex gene expression in experimental murine colitis. *Gastroenterology*. 2006;131(2):497-509.

Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell*. 1999;3(5):543–553.

Wang Z, Yang J, Kirk C, Fang Y, Alsina M, Badros A, Papadopoulos K, Wong A, Woo T, Bomba D, Li J, Infante JR. Clinical pharmacokinetics, metabolism, and drug-drug interaction of carfilzomib. *Drug Metab Dispos*. 2013;41(1):230-7.

Wilhelmsson A, Cuthill S, Denis M, Wikström AC, Gustafsson JA, Poellinger L. The specific DNA binding activity of the dioxin receptor is modulated by the 90 kd heat shock protein. *EMBO J*. 1990;9:69-76.

Yang H, Garzel B, Heyward S, Moeller T, Shapiro P, Wang H. Metformin represses drug-induced expression of CYP2B6 by modulating the constitutive androstane receptor signaling. *Mol Pharmacol*. 2014;85(2):249–260.

Yoshinari K, Ueda R, Kusano K, Yoshimura T, Nagata K, Yamazoe Y. Omeprazole transactivates human CYP1A1 and CYP1A2 expression through the common regulatory region containing multiple xenobiotic-responsive elements. *Biochem Pharmacol*. 2008;76:139–145.

Yu J, Petrie ID, Levy RH, Ragueneau-Majlessi I. Mechanisms and clinical significance of pharmacokinetic-based drug-drug interactions with drugs approved by the U.S. Food and Drug Administration in 2017. *Drug Metab Dispos*. 2018;47(2):135-144.

Zamek-Gliszczyński MJ, Mohutsky MA, Rehmel JLF, Ke AB. Investigational small-molecule drug selectively suppresses constitutive CYP2B6 activity at the gene transcription level: physiologically based pharmacokinetic model assessment of clinical drug interaction risk. *Drug Metab Dispos*. 2014;42(6):1008-1015.

Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. 2013;138(1):103-141.

Zhang S, Pan X, Jeong H. GW4064, an agonist of farnesoid X receptor, represses CYP3A4 expression in human hepatocytes by inducing small heterodimer partner expression. *Drug Metab Dispos*. 2015;43(5):743-748.

Zhang Y, LaCerte C, Kansra S, Jackson JP, Brouwer KR, Edwards JE. Comparative potency of obeticholic acid and natural bile acids on FXR in hepatic and intestinal in vitro cell models. *Pharmacol Res Perspect*. 2017;5(6): e00368.

ガイダンス・ガイドライン

European Medicines Agency. Guideline on the investigation of drug interactions. London, UK: EMA; 2012.

U.S. Food and Drug Administration. Guidance for industry. In vitro metabolism- and transporter-mediated drug-drug interaction studies (draft guidance). Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER); 2017.

医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン、独立行政法人医薬品医療機器総合機構；2018.

医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドラインに関する質疑応答集（Q&A）、独立行政法人医薬品医療機器総合機構；2018.

本論文に関連した学会発表

2019 年 12 月 12 ～14 日 (11 日発表)

日本薬物動態学会 第 34 回年会 つくば

演題 : Evaluation of in vitro CYP1A2 down-regulation using cryopreserved human hepatocytes

Chihiro Ishida, Seigo Sanoh, Yaichiro Kotake

本論文の基礎となる原著

Ishida C, Sanoh S, and Kotake Y. CYP1A2 down-regulation by obeticholic acid: usefulness as a positive control for the in vitro evaluation of drug-drug interactions. *J Pharm Sci.* 2019;108(12):3903-3910.

謝辞

本研究は広島大学大学院医系科学研究科 古武 弥一郎 教授、太田 茂 教授（現・和歌山県立医科大学・教授）のもとで行われたものであり、幅広い見地・経験から御指導、御鞭撻を賜りました同教授に謹んで感謝申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、終始御懇篤なる直接の御指導並びに多大なる御助言・御指導を頂きました 広島大学大学院医系科学研究科 佐能 正剛 助教 に心から感謝申し上げます。

本研究において御助言を賜りました 広島大学大学院医系科学研究科 小澤 孝一郎 教授、同研究科 田原 栄俊 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究において審査、御助言を賜りました 広島大学大学院医系科学研究科 松尾 裕彰 教授、同研究科 紙谷 浩之 教授、同研究科 湯元 良子 准教授 に厚く御礼申し上げます。

最後に、博士号取得への理解を示し、日々支えてくれた家族に心から感謝致します。