医薬品の研究開発促進を目的としたバイオマーカーに 基づく Pharmacokinetic-Pharmacodynamic モデルの 構築及びその活用に関する研究

2024

清水 亮輔

緒言	Ì		1
第1	章		5
1	. 緒	信	5
2	. 実	験方法	5
	2-1	実験材料	5
	2-2	Losartan 及び hydrochlorothiazide の薬物動態学的検討	6
	2-3	血圧測定	7
	2-4	血漿中レニン活性の評価	7
	2-5	データ解析	8
3	. 結	课	11
	3-1	Losartan 及び hydrochlorothiazide の薬物動態解析結果	
	3-3	血漿レニン活性のプロファイル	14
	3-4	メカニズムに基づく PK-PD モデリング	15
	3-5	モデルの堅牢性評価	
4	. 考	察	19
5	. 小	括	23
第2	2章		24
1	. 緒言	â	24
2	. 実駒	黄方法	25
	2-1	実験材料	25
	2-2	ASO の薬物動態及び薬力学的評価	25
	2-3	ASO 投与後の濃度及びバイオマーカー測定	
	2-4	データ解析	27
	2-5	PK-PD モデリング	27
3	. 結	禄	
	3-1	血漿中及び肝臓中 ASO 濃度の薬物動態解析	
	3-2	肝臓中 Apo-B mRNA 及び血漿総コレステロールの PK-PD 解析	
4	. 考	察	
5	. 小	括	
第3	3章		
戶	序論…		
舅	第1節	Ĵ	40
	1.	緒言	40
	2.	実験方法	40

3.	結果	42				
4.	考察	45				
第2節	წ	47				
1.	緒言	47				
2.	実験方法	47				
3.	結果	51				
4.	考察	54				
5.	小括	57				
結語		58				
論文目氨	₫	60				
謝辞	谢辞66					

緒言

近年, 医薬品の研究開発において, 開発効率の著しい低下が大きな問題となっている. 特に, 第2相試験における Proof of concept (PoC) 取得率の低さが最大の課題とされている^{1,2)}. この 原因の 1 つとして, 主に疾患メカニズムが明らかでない領域へ創薬ターゲットが変遷しているこ とが考えられている. 第2相試験における臨床試験の失敗は, 製薬産業のみならず新薬を待つ 患者に対しても影響が大きいことから³⁾, この問題を打開すべく, 規制当局は modeling and simulation (M&S) に関連するガイドライン/ガイダンス⁴⁻⁶⁾を発出するなど, M&S を活用した医 薬品の開発戦略立案や合理的な意思決定を推進している³⁾.

薬物動態–薬力学 (Pharmacokinetics-Pharmacodynamics [PK-PD]) M&S は,数理モデルを 用いて薬物動態と薬物の有効性を定量的に関係付け,その結果から様々な試験条件での有 効性,成功確率等を予測する方法のことである^{7,8)}. PK-PD M&S を活用することにより,様々な 投与条件における経時的な薬効推移を記述できると考えられていることから,用法・用量の設 定に有用な情報を提供することが可能であると考えられている³⁾. PK-PD M&S は, Figure 1 に 示したように,様々な用語の変遷を経て,現在では,モデルから得られる情報に基づく医薬品 の研究及び開発 "Model Informed Drug Discovery & Development" (MID3) と称され, PK-PD M&S の有用性が広く知られるようになっている⁹⁾.



Figure 1. Model Informed Drug Discovery and Development (MID3): genesis of terminology (参照論文9抜粋).

Figure 1 に示すように、PK-PD M&S は以前から医薬品開発に活用される解析手法として使 用されたことから、現在でもその活用は臨床試験結果に基づく結果に対する適用が中心となっ ている. 特に母集団アプローチを用いた解析は広く活用されている. 本方法は, まず臨床試験 データから母集団薬物動態モデルを構築し,薬物動態パラメータや薬物動態に影響を及ぼす 共変量を推定する.その後,推定されたパラメータに基づき事後解析を実施し,様々な条件に おける血漿中濃度推移や薬効の予測を実施する.これら一連の解析を通して用法・用量の妥 当性の説明,臨床試験条件の精緻化等に活用されている¹⁰⁻¹²⁾.しかし,母集団薬物動態解析 は実データを基に実施する解析であることから,臨床試験を実施する際の用法・用量の適切性 を議論することは難しいと考えられる.そこで,創薬過程における非臨床試験結果に基づく PK-PD M&S は、臨床試験条件の設定において有用な情報を提供可能であると考えられてい る⁹⁾. 近年, 欧州製薬団体連合会の MID3 ワークグループより報告された, MID3 に基づく創薬 研究及び開発事例をまとめたホワイトペーパーの中でも PK-PD M&S の活用事例が多数提示 されたが、実際の非臨床試験結果に基づく活用例は臨床試験から得られるデータに対する解 析事例と比べて非常に少なかった⁹. また, 近年では低分子医薬品だけでなく, 核酸医薬品や 高分子医薬品の研究開発も多数報告されており,医薬品のモダリティは変化する一方で,各モ ダリティの開発支援につながるような非臨床試験結果に基づく PK-PD M&S に関する研究は進 んでいない.非臨床試験は,血漿中濃度推移や薬効について,ヒトから得られる情報だけでは なく、ヒトからは得ることが困難な標的組織における曝露や様々な有効性又は安全性の指標で あるバイオマーカーの変化を評価できる. つまり, 臨床試験で想定されうる有効性や安全性に 対しても臨床試験の実施より前に,詳細なメカニズムに基づく検討が可能である.

バイオマーカーは、「通常の生物学的過程,病理学的過程,もしくは治療的介入に対する薬 学的対応の指標として、客観的に評価される特性」と定義されている¹³⁾.バイオマーカーには、 薬力学マーカー、毒性マーカー、代替マーカー等に分類されているが、それぞれ薬剤の作用 機序の評価、安全性の評価及び臨床試験の真のエンドポイントを代替評価するために利用さ れる.バイオマーカーは in vitro 試験や動物モデルを用いた in vivo 試験のような初期の有効性 及び安全性評価、さらに初期の臨床試験における proof of mechanism (PoM) や PoC の確立 において大きな役割を果たすと考えられている¹³⁻¹⁵⁾.また、これらのバイオマーカーの反応は個 人差が認められることから、個別化医療にも活用可能と考えられている.その一方で、これらの バイオマーカーを利活用するためには、薬物投与後の曝露、バイオマーカーの変動及び有効 性又は安全性との間に定量的な関係が明らかである必要があると考えられる.したがって、非 臨床試験結果に基づく PK-PD M&S を実施する場合、初期の臨床試験条件の設定や PoM/PoC 取得確度向上に対して有用な情報を提供し創薬の成功確率向上に繋げるために, 非臨床試験で評価した薬力学バイオマーカーや代替マーカーの変化を定量的に組み込んだ PK-PD M&S を実施することが有用であると考えた.

そこで、本研究では PK-PD モデルの構築においてバイオマーカーの変動を考慮することの 有用性を検証するため、まず第1章及び第2章において、低分子化合物及び新規モダリティと して研究開発が盛んな核酸医薬品の1つであるアンチセンス医薬品を用いて非臨床試験に基 づく PK-PD モデルを構築し、シミュレーションを通して臨床で確認されている様々な薬効プロフ ァイルをバイオマーカーの変動を考慮することで定量的に説明可能か検証した.

第1章では,高血圧治療薬である losartan (アンジオテンシンII受容体拮抗薬)及び hydrochlorothiazide (チアジド系利尿薬)を併用投与した時の薬物動態及び血圧低下効果を説 明できる PK-PD モデルの構築を検討した.この際,高血圧治療薬ガイドライン等でも報告され ているように,両薬剤の併用投与により薬力学的な相互作用が認められたため,メカニズムに基 づく薬力学マーカーとして血漿レニン活性を評価するとともに PK-PD モデルに組み込む方法を 検討し,予測性を評価した.

また,第2章では,近年新規創薬モダリティの1種として注目されているアンチセンス医薬品 投与後の薬物動態及び薬効を評価し,薬力学的及び代替マーカーの変動を考慮した PK-PD モデルの構築を検討した.アンチセンスは投与すると速やかに血漿中から24時間程度で消失 する一方,標的組織(主に肝臓)に滞留し1か月以上の長期間にわたって薬効を示すことが 知られており,動物実験や臨床試験で得られる血漿中濃度のみでは薬効を説明することが困 難であると考えられていた.そこで本研究ではアポリポプロテインB(Apo-B)のmRNAを標的 としたアンチセンスを投与後の血漿中濃度及び組織中の薬物濃度,薬力学マーカーとして標 的である Apo-BのmRNA 活性,及び代替マーカーとして血漿中コレステロール濃度推移に基 づき,これら4つの要素を統合した PK-PD モデルの構築を検討した.また,併せて本モデルの 予測性も評価した.

上記の検討を進める中で,生体のシステムに依存するパラメータは化合物に関わらず変わらないと考えられることから,一度 PK-PD モデルを構築すれば薬物の血漿中濃度推移と標的分子に対する活性のデータがあれば様々な薬物の有効性を推定できるのではないかと考えた. つまり,1 種類の標的分子に対して非常に多くの医薬品を評価するときに,代表的な薬剤の in vitroの薬理活性に基づくPK-PDモデルを構築すれば,医薬品候補化合物の血漿中濃度推移及び in vitro 薬理活性のデータを用いて効率よく有効性を予測でき,化合物の選抜にも有用な情報を提供できるものと考えた.そこで PK-PD モデルのさらなる活用方法として,臨床でのバイ

3

オマーカーの変化や有効性の予測につなげ,開発候補化合物の選抜に活用可能か検討するために, in vitro 試験の結果を PK-PD モデルに組み込む検討を実施した.

具体的には、第3章において、in vitro 情報として薬力学マーカーであるトランスポーターの 占有率を計算するために必要な結合速度 (kon) 及び解離速度 (koff) を得るための数理モデ ルを、in vitro 評価系のメカニズムに沿って構築した.このとき、モデル化合物として、ドパミン取 り込みトランスポーター (DAT) 阻害作用を示す methylphenidateを用いた.さらに、その結果及 び methylphenidate をラットへ投与した後の薬物動態プロファイルから薬力学マーカーの1つで ある DAT 占有率を算出し、脳内におけるドパミンの遊離量の変化を解析可能な PK-PD モデル を構築し、DAT 占有率とドパミンの遊離量との関係を考察した.

以下,各章にわたり,得られた知見の詳細を記載するとともに,最後に総括する.

第1章

血漿レニン活性を指標とする高血圧治療薬併用投与時の相乗的な血圧低下

効果に対する PK-PD モデルを用いた定量的評価

1. 緒言

第1章では、低分子化合物を用いた PK-PD モデルの構築を検討した. 高血圧治療薬にお いて、アンジオテンシンII (AngII) 受容体阻害薬 (ARB) 及びチアジド系利尿薬は降圧効果の 増強及び副作用の抑制作用が認められていることから,高血圧治療ガイドラインで併用投与が 推奨されている¹⁶. このように降圧剤同士の薬物の併用療法を行う際や, 患者ごとに異なる薬 物治療を行うことが望ましい場合,画一的な薬物治療では薬効が不十分であり降圧目標まで到 達しない,血圧が低下しすぎてしまうといった問題が生じる可能性がある.さらに,薬物を併用 投与すること自体の有用性などの情報は広く知られているが併用投与時の薬物の PK と血圧低 下効果の変化を定量的に検討した例は少ないため,併用投与した際の PK に関する薬物間相 互作用や相乗的な血圧低下効果の程度等が明らかではなかった. そこで本研究では, ARB と して losartan, チアジド系利尿薬として hydrochlorothiazide を選択し, まず高血圧の病態モデル である高血圧自然発症ラット (SHR) へ両薬物併用投与後の薬物動態および血圧を測定し, 相互作用の程度を評価した.これまで薬力学的相互作用をモデルに組み込む方法に関する報 告は殆どなかったことから,まず両薬物併用投与時の相互作用のメカニズムから薬力学的相互 作用を評価可能と考えられた血漿レニン活性¹⁷⁻¹⁹⁾を薬力学マーカーとして選択し、その推移 を評価した. さらに, 血漿レニン活性の推移を含む PK-PD モデルの構築を通して, 臨床及び非 臨床で認められる相乗的な血圧低下効果を定量的に説明可能か検討した.

2. 実験方法

2-1 実験材料

Losartan 及び t-Butyl Methyl Ether (MTBE) は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から, hydrochlorothiazide は Sigma Chemical 社 (St Louis, USA) から購入した. Heparin 及び monoethanolamide はナカライテスク社 (Kyoto, Japan) から購入した. その他の試薬及び溶媒 は市販の特級以上の製品を使用した.

5

2-2 Losartan 及び hydrochlorothiazide の薬物動態学的検討

2-2-1 実験動物

実験動物として、雄性自然発症高血圧ラット SHR (15~25 週令、日本エスエルシー(株)、 Shizuoka, Japan)を用いた.実験前日にエーテル麻酔下、ラットの頸静脈 (ファイコンチューブ [富士システムズ株式会社. Tokyo, Japan]/PE50 [Clay Adams, Parsippany, USA], 心臓方向に 2 cm)、および大腿動脈 (SP10 [株式会社夏目製作所, Tokyo, Japan]/PE50, 中心動脈側へ 3 cm) にカニュレーションを施した. 挿入したカニューレと血管を堅く結紮し、カニューレの一端 を、皮下を通して後頭部へと導いた. その後、切開部を縫合しカニューレ内に生理食塩液を満 たした. 実験は 15 時間以上の回復時間の後に行った.

2-2-2 投与液の調整及び投与方法

Losartan は生理食塩液に溶解して用いた. Hydrochlorothiazide は Kim GH らの方法²⁰⁾ に 従い 1.7% monoethanolamide を含む生理食塩水に溶解して用いた.

薬物の投与は、ラットの頸静脈より i.v. bolus 投与した. 投与量は losartan 1-10 mg/kg, hydrochlorothiazide 1-10 mg/kg で行った. また、両薬物の混合した投与液を調製し、単独投与時と同様にラットの頸静脈より併用投与をした.

2-2-3 薬物の投与及び血漿中薬物濃度の定量

実験は無麻酔・非拘束下,本章 2.2.2 項に従って薬物を投与した.血液は大腿動脈より経時 的に 0.4 mL 採取し,採血後直ちに同量の血液を輸血した.輸血用の血液はクエン酸処理した ものを用いた.採血時間は i.v. bolus 投与後 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 480 及び 600 分とした.採血した血液は 200 IU/mL heparin 溶液 10 µL を加えたチューブに移 し,直ちに遠心分離 (10,000 rpm, 5 分, 4℃) して 200 µL の血漿を得た.得られた血漿は定量 時まで-20℃で冷凍保存した.

得られた血漿から, losartan は以下の方法で測定した.

つまり, 血漿中 losartan 濃度の測定は高山ら²¹⁾ 及び Farthing ら²²⁾ の方法を改良し, 次のよう に行った. 血漿 200 μL に 0.1 mol/L 塩酸 100 μL, 精製水 100 μL, MTBE 800 μL を加えて撹 拌後, 遠心分離 (5,000 rpm, 5分) した. Losartan の濃度が 10 μg/mL 以上となるものは血漿に 精製水を加えて 20 倍希釈を行った. 有機層をチューブに採取し蒸発乾固した. 残りの水相に さらに MTBE を 800 μL を加えて攪拌後, 遠心分離 (15,000 rpm, 5分) した. 有機層を先のチ ューブに追加し, さらに蒸発乾固した. これを移動相 100 μL で再溶解させ, 40 μL を HPLC に 注入し, HPLC-UV 法により測定した. 測定条件は以下の通りである. Pump: intelligent HPLC pump PU-980 (日本分光株式会社, Tokyo, Japan) Injector: intelligent sampler 851-AS (日本分光株式会社, Tokyo, Japan) Column: Unison UK-C18 (3µm) (75mm×3mm, Imtakt, Kyoto, Japan) Detector: intelligent UV/ VIS detector UV-970 (日本分光株式会社, Tokyo, Japan) Mobile phase: 25 mmol/L phosphoric acid : acetonirile=80:20 (v/v) Flow rate: 0.7 mL/min Column temperature: ambient Wavelength: 230 nm

また, hydrochlorothiazide は以下の方法で測定した.

つまり, 血漿 100 μL に methanol 0.5 mL を加えて撹拌後, 遠心分離 (15,000 rpm, 5 分) した. 上清 10 μL を UPLC に注入し, UPLC-MS/MS 法により測定した. 測定条件は以下の通りであ る.

System: ACQUITYTM Ultra Performance LC (Waters Co. Ltd., Milford, NE) Mobile phase: 10mmol/L ammonium acetate : methanol=70 : 30 (v/v) Flow rate: 0.5 mL/min Ionization: ESI Column temperature: 40°C Collision: 18.00 eV Detection: 295.94 m/z > 269 m/z

2-3 血圧測定

2-2 と同様にカニューレを施した SHR へ losartan 及び hydrochlorothiazide を単回 i.v. bolus 投与した. 血圧は薬物投与前 (カニューレ処置前及び投薬直前) 及び投薬後経時的にテー ルカフ法 (BP-98A-L, ソフトロン社, Tokyo, Japan) を用いて測定した. 各個体に対して時点毎 に 5 回収縮期血圧を測定し, その平均値を測定値として取り扱った.

2-4 血漿中レニン活性の評価

2-2 と同様にカニューレを施した SHR ~ losartan 及び hydrochlorothiazide を単回 i.v. bolus 投与した. 投与直前及び投与後 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 及び 144 時間に大腿動脈より血液を 採取し, EDTA-2Na の入った氷冷チューブに移した後, 10,000 rpm で 3 分間遠心分離した. 得

られた血漿から,血漿中レニン活性をラジオイムノアッセイキット (ヤマサ社, Chiba, Japan) を 用いて測定した.

2-5 データ解析

2-5-1 母集団薬物動態解析

Losartan 及び hydrochlorothiazide の薬物動態パラメータは NONMEM version VI (ICON Development Solutions, Ellicott City, MD, USA)²³⁾ を用いて first order 法により行った. 薬物 i.v. bolus 投与後の losartan の血漿中濃度推移は 3-コンパートメントモデルに従うと仮定した (ADVAN11, TRANS4). 個体間変動については CL, V₁ に対数誤差モデルをそれぞれ以下の ように仮定した.

 $CL_{Lj} = \widetilde{CL}_L \cdot \exp(\eta_{LCL_j})$ $V_{1L_j} = \widetilde{V}_{1L} \cdot \exp(\eta_{LV_j})$ $C_{L_{ij}} = \widetilde{C}_{L_{ij}} \cdot \exp(\varepsilon_{L_{ij}})$

ここで CL_{L_j} 及び V_{1L_j} は losartan 投与時の動物 j の CL, V_1 の値, \widetilde{CL}_L 及び \widetilde{V}_{1L} は losartan の母 集団平均値を示す. η_{LCL_j} 及び η_{LV_j} はそれぞれ平均が 0 で分散が ω^2 の正規分布に従う確率変 数である. $C_{L_{ij}}$ は動物 j の i 番目の時間 t_{ij} の時の血漿中 losartan 濃度の実測値を, $\widetilde{C}_{L_{ij}}$ は動物 jの血漿中 losartan 濃度の母集団推定値を示す. ε_{ij} は losartan において平均が 0 で分散が σ^2 の正規分布に従う確率変数を示す.

また hydrochlorothiazide の血漿中濃度推移は 2-コンパートメントモデルに従うと仮定した (ADVAN3 TRANS4). 個体間変動については CL に対数誤差モデルを以下のように仮定した.

 $CL_{Hj} = \widetilde{CL}_H \cdot exp(\eta_{HCLj})$

 $C_{Hij} = \tilde{C}_{Hij} \cdot \exp(\varepsilon_{Hij})$

ここで CL_{Hi} は hydrochlorothiazide 投与時の動物 j の CL の値, \widetilde{CL}_{H} は hydrochlorothiazide の 母集団平均値を示す. η_{HCLj} は平均が 0 で分散が ω^2 の正規分布に従う確率変数である. C_{Hij} は 動物 j の i 番目の時間 t_{ij} の時の血漿中 hydrochlorothiazide 濃度の実測値を, \tilde{C}_{Hij} は動物 j の 血漿中 hydrochlorothiazide 濃度の母集団推定値を示す. ε_{Hij} は hydrochlorothiazide について 平均が 0 で分散が σ^2 の正規分布に従う確率変数を示す.

コンパートメントモデルの決定は,赤池情報量基準 (Akaike's Information Criterion: AIC)の 値を指標に行った.また,薬物動態パラメータに対する影響因子の効果の判定は尤度比検定 により行った.つまり,目的関数の差 (Log Likelihood Difference; LLD)が χ²分布に従い自由 度1のとき,有意水準 5%で LLD>3.84 であった場合,その因子の影響を統計学的に有意と判定した.

2-5-2 血圧データの解析

血圧低下効果の薬理効果-時間曲線下面積 (AUE) は投与開始後 144 時間までの血圧を 基底値からの低下分として台形法により算出した.血圧の基底値は、カニュレーション前および 薬物投与直前の血圧の平均値とした.

2-5-3 PK-PD モデリング

薬力学的パラメータは Berman らのアルゴリズムに基づいた小泉, 掛見らにより作成された非線形最小2 乗法解析プログラム (FKDM)²⁴⁾ によりパラメータを決定した. 微分方程式は Runge-Kutta-Gill 法により数値積分を行うことにより計算した.

Figure1-1 に losartan を投与した時の PK-PD モデルの概要図を示す.



Figure 1-1. Diagrammatic representation of the PK-PD model for the hypotensive effect.

$$dA_{LOS1}/dt = Lk_{21} \cdot A_{LOS2} + Lk_{31} \cdot A_{LOS3} - (Lk_{12} + Lk_{13} + Lk_{10.h}) \cdot A_{LOS1}$$
(1-1)

$$dA_{LOS2}/dt = Lk_{12} \cdot A_{LOS1} - Lk_{21} \cdot A_{LOS2}$$
(1-2)

$$dA_{LOS3}/dt = Lk_{13} \cdot A_{LOS1} - Lk_{31} \cdot A_{LOS3}$$
(1-3)

$$C_{LOS1} = A_{LOS1} / LV$$

ここで、ALOS1 は中央コンパートメントにおける losartan の量 (µg)、ALOS2 及び ALOS3 は末梢コン パートメントにおける losartan の量 (µg)、LV は中心コンパートメントにおける losartan の分布容 積、Lk₁₂、Lk₂₁、Lk₁₃、Lk₃₁ 及び Lk₁₀ は losartan の一次速度定数 (/min)、CLOS1 は血漿中 losartan 濃度 (µg/mL) を示す.時間 0 のとき、ALOS1 は投与量、ALOS2 及び ALOS3 は 0 である. PK-PD 解析には逐次解析法を使用し、薬物動態パラメータには推定された母集団平均値を使 用した.

血漿レニン活性及び血圧低下効果は,間接反応モデルと薬効コンパートメントモデルを統合 して解析した.本試験では losartan の血圧低下効果に対する血漿レニン活性の寄与に焦点を 当てた.つまり,以下3点を仮定した.

- 1. Losartan は X1 及び X2 で表すコンパートメントを介して血漿レニン活性を増加させる
- 2. X1 及び X2 コンパートメントに移行する losartan 量は中心コンパートメントの薬物量と比 べて無視できるほど少ない
- 3. 血漿レニン活性の増加は薬効コンパートメントを介して血圧低下効果に作用する

モデルの式は以下の通りである.

$$\begin{aligned} dC_{X1}/dt &= Xk_{in} \cdot C_{LOS1} - Xk_{out} \cdot C_{X1} - Xk_{12} \cdot C_{X1} + Xk_{21} \cdot C_{X2} \quad (1-5) \\ dC_{X2}/dt &= Xk_{12} \cdot C_{X1} - Xk_{21} \cdot C_{X2} \quad (1-6) \\ dA_{PRA}/dt &= Rk_{in} \cdot S(t) - Rk_{out} \cdot A_{PRA} \quad (1-7) \\ S(t) &= 1 + RE_{max} \cdot C_{X1}/(REC_{50} + C_{X1}) \quad (1-8) \end{aligned}$$

ここで、C_{X1}及び C_{X2}は X1 及び X2 コンパートメント中の losartan 濃度 (µg/mL), Xk₁₂, Xk₂₁, Xk_{in} 及び Xk_{out}は 1 次速度定数 (/min), A_{PRA} は血漿レニンの活性コンパートメント中の血漿レニン活性 (ng·AngI/mL/hr), RE_{max} は血漿レニン活性の最大効果 (ng·AngI/mL/hr), REC₅₀ は RE_{max}の 50%に到達するために必要な LOS 濃度 (µg/mL), Rk_{in} は血漿レニン活性の生成に関 するゼロ次速度定数 (ng·AngI/mL/hr²), Rk_{out} は血漿レニン活性の分解に関する 1 次速度定数 (/min) を示す. Losartan 投与前は Rk_{out} = Rk_{in}×A_{PRA0} で記述できる. また, 血漿レニン活性は以 下の式にしたがって血圧を低下させると考えた.

$$dC_E/dt = Pk_{in} \cdot A_{PRA} - Pk_{out} \cdot C_E \tag{1-9}$$

Blood pressure =
$$E_0 - PE_{max} \cdot C_E / (PEC_{50} + C_E)$$
 (1-10)

ここで、C_Eは薬効コンパートメント中の血漿レニン活性値 (ng·Ang I/mL/hr)、Pk_{in}及び Pk_{out}は1 次速度定数 (/min)、PE_{max}は血漿レニン活性の最大降圧効果 (mmHg)、PEC₅₀はPE_{max}の50% に到達するために必要な血漿レニン活性 (ng·AngI/mL/hr)、E₀は血圧のベースライン (mmHg) を示す.

3. 結果

3-1 Losartan 及び hydrochlorothiazide の薬物動態解析結果

Losartan を単回投与した血漿中濃度が線形性を示したこと及び3相性の消失を示したことから, losartanのPK モデルは3-コンパートメントモデルを選択した.推定された薬物動態パラメータを Table 1-1 に示す. Hydrochlorothiazide 併用の影響を検討するために母集団薬物動態解 析を実施した結果,得られたパラメータから推定される個々の血漿中濃度予測値は実測値を適切に記述可能であり (Figure 1-2 [A] 及び Figure 1-3), hydrochlorothiazide の併用投与によって losartan の消失クリアランスは25%低下した一方,分布容積には影響が見られないことが明ら かになった.

同様に、hydrochlorothiazide 単回投与の血漿中濃度推移が2相性の消失を示したことから、 hydrochlorothiazideのPKモデルは2-コンパートメントモデルを選択した. Losartan 併用投与の 影響を検討するために母集団薬物動態解析を実施した結果、losartanはhydrochlorothiazideの 薬物動態に影響を示さなかった. hydrochlorothiazideの血漿中濃度推移についても、解析によ って得られた個々の予測値は実測値を適切に記述可能であった (Figure 1-2 [B]).

Fixed effect	Random effect				
Losartan (LOS)					
$CL_{LOS}(mL/min) = 2.54 \times 0.759^{HCTZ}$	$CL_{LOS-ETA} = 0.367$	CV (%) = 60.6			
$Q2_{LOS}$ (mL/min) = 0.938					
$Q3_{LOS} (mL/min) = 7.38$					
$V1_{LOS}$ (mL) = 44.2	$V1_{LOS-ETA} = 0.487$	CV (%) = 69.9			
$V2_{LOS}$ (mL) = 210					
$V3_{LOS} (mL) = 75$					
	$SIGMA_{LOS} = 0.0847$	CV (%) = 29.1			
Hydrochlorothiazide (HCTZ)					
CL_{HCTZ} (mL/min) = 14.7	$CL_{HCTZ\text{-}ETA} = 0.0210$	CV (%) = 39.3			
$Q2_{HCTZ}$ (mL/min) = 10.3					
$V1_{HCTZ}$ (mL) = 39.3					
$V2_{HCTZ}$ (mL) = 802					
	$SIGMA_{HCTZ} = 0.0404$	CV (%) = 20.1			

Table 1-1. Population pharmacokinetic parameters of Losartan and Hydrochlorothiazide

CL_{LOS}, CL_{HCTZ}: the total clearances for Losartan and Hydrochlorothiazide;

 $Q2_{LOS}$, $Q3_{LOS}$, $Q2_{HCTZ}$: the clearances for Losartan and Hydrochlorothiazide for the peripheral compartments; $V1_{LOS}$, $V1_{HCTZ}$: the distribution volume of the central compartment for losartan and hydrochlorothiazide; $V2_{LOS}$, $V3_{LOS}$, $V2_{HCTZ}$: the distribution volume of the peripheral compartment for losartan and hydrochlorothiazide; CV: coefficient of variance; SIGMA_{LOS}, SIGMA_{HCTZ}: residual variability for losartan and hydrochlorothiazide. HCTZ = 0 for without hydrochlorothiazide, HCTZ = 1 for co-administered with hydrochlorothiazide.



Figure 1-2. Pharmacokinetic interaction in coadministration of losartan and hydrochlorothiazide. [A] Effect of hydrochlorothiazide in plasma losartan concentration after administration of losartan with and without hydrochlorothiazide. [B] Effect of losartan in plasma hydrochlorothiazide concentration after administration of hydrochlorothiazide with and without losartan. Each symbol indicates an individual animal (n = 3-5). LOS = losartan, HCTZ = hydrochlorothiazide.



Figure 1-3. Goodness-of-fit the final population pharmacokinetic model for losartan. Plots are individual data. LOS = losartan.

3-2 Losartan 及び hydrochlorothiazide の血圧低下効果

Figure 1-4 (A) 及び **Figure 1-4 (B)** に losartan 及び hydrochlorothiazide を単独または併用 単回静脈内投与した時の収縮期血圧 (SBP) の推移を示す. Losartan を 5 mg/kg で単回投与 したとき SBP は薬物投与後 72 時間にわたって持続的に低下した一方, hydrochlorothiazide を 5 mg/kg で単回投与したとき SBP はほとんど変化しなかった. Losartan と hydrochlorothiazide を 併用投与したとき, SBP は薬物投与後 24 時間まで併用薬の用量に依存した低下を示し, 血圧 低下効果は薬物投与後 144 時間まで持続した. 効果-時間曲線下面積 (AUE) が示す通り, こ の相乗効果は losartan 及び hydrochlorothiazide の投与量に依存して増強した (Figure1-4 [C] 及び **Figure1-4 [D]**).



Figure 1-4. The changes of blood pressure (A, B) and AUE (C, D) after administration of losartan and hydrochlorothiazide. Compared with the single administration, coadministration of both drugs reduced blood pressure synergistically. Values represent the mean \pm S.E.M. (n = 3-4). LOS = losartan, HCTZ = hydrochlorothiazide.

3-3 血漿レニン活性のプロファイル

Losartan 及び hydrochlorothiazide の併用投与において,薬物動態学的な相互作用はほとん ど認められなかった一方,相乗的な血圧低下効果が認められたことから,この相乗効果は両薬 物併用投与による薬力学的なメカニズムに基づく相互作用の可能性が示された.そこで,両薬 物の薬理メカニズムから相互作用を考察するため,薬力学マーカーとして血漿レニン活性の推 移の変化が影響する可能性が考えられた. Figure 1-5 に losartan 及び hydrochlorothiazide を 単独または併用して単回静脈内投与した時の血漿レニンの活性の経時推移を示す. 薬物投与 後の血漿レニンの活性は一時的に増加し, 72 時間かけて徐々にベースラインまで低下した. ま た, losartan と hydrochlorothiazide を併用投与したとき, 血漿レニン活性は併用した losartan 又 は hydrochlorothiazide の投与量に依存して増加した.



Figure 1-5. The time-course of plasma renin activity after coadministration of losartan and hydrochlorothiazide. Plots represent the mean \pm S.E.M. (n = 2-3).LOS = losartan, HCTZ = hydrochlorothiazide.

3-4 メカニズムに基づく PK-PD モデリング

得られた血漿レニン活性及び SBP の変化について, Figure 1-1 に示した losartan 及び hydrochlorothiazide 併用投与時の血漿レニンの活性及び血圧低下効果に対する PK-PD モデ ルを用いて解析を実施した. モデル構造及びパラメータの詳細は本章 2-5 項に記載した通りで あった. Losartan と hydrochlorothiazide を併用投与した時に hydrochlorothiazide の薬物動態に 変動が認められなかったこと及び hydrochlorothiazide のみの投与では血圧, 血漿レニン活性共 に大きな変動が認められなかったことから, losartan の薬物動態, 血漿レニン活性及び血圧低 下効果に対する PK-PD モデルを構築し, モデルの中に hydrochlorothiazide の影響を組み込 んだ. また, losartan の薬物動態と血漿レニン活性の変動の間に時間的な遅れが確認されたこ とから, 時間遅れコンパートメントとして X1 及び X2 コンパートメントを挿入し, 間接反応モデル を用いて losartan 投与後の血漿レニン活性を記述した. また, 血漿レニン活性と血圧低下効果 の間にも時間的な遅れが確認されたことから, Shiner らの薬効コンパートメント同様, 時間遅れ

コンパートメントを介して、血漿レニン活性が血圧低下効果を示すものとして仮定した.血圧低 下効果は E_{max} モデルを用いて記述した. Table 1-2 にモデルに含まれる個々のパラメータ推定 値を示す.また, Figure 1-6 に血漿レニンの活性の実測値及び予測値の比較及び Figure 1-7 に血圧変動の実測値と予測の比較を示す.推定されたパラメータを使用することで、モデルか ら推定された予測値は、血漿レニン活性及び SPB の実測値を適切に記述可能であった. hydrochlorothiazide 併用投与時に確認された相乗効果を説明するため、RE_{max} を hydrochlorothiazide の投与量に応じて推定したが、Figure 1-8 に示す通り、hydrochlorothiazide の投与量と投与量毎に算出した RE_{max}の間に相関が認められた.

Table 1-2. Pharmacodynamic parameter estimates for hypotensive effect after coadministration of losartan and hydrochlorothiazide in rats

Parameters		Estimates	
Xk ₁₂	(min ⁻¹)	0.00732 ± 0.0168	
Xk ₂₁	(min ⁻¹)	0.00123 ± 0.000720	
Xkout	(min ⁻¹)	0.0162 ± 0.0264	
REC ₅₀	(µg/mL)	0.585 ± 0.0717	
Rk _{out}	(hr ⁻¹)	3.14 ± 26.5	
RE _{max} (HCTZ 1 mg/kg)		14.0 ± 2.52	
RE _{max} (HCTZ 5 mg/kg)		15.7 ± 2.36	
RE _{max} (HCTZ 10 mg/kg)		21.5 ± 3.61	
Pkout	(\min^{-1})	0.00244 ± 0.000440	
PEC ₅₀	(ng AngI/mL/hr)	85.5 ± 118	
PE _{max}	mmHg	180 ± 208	

Data represents the computer-fitted value \pm SD. HCTZ = hydrochlorothiazide.



Figure 1-6. Comparison of the theoretical value with the observed data for PRA after coadministration of losartan and hydrochlorothiazide. Solid lines are the theoretical values. Plots represent the mean \pm S.E.M. (n = 2-3). LOS = losartan, HCTZ = hydrochlorothiazide.



Figure 1-7. Comparison of the theoretical value with the observed data for hypotensive effect after coadministration of losartan and hydrochlorothiazide. Solid lines represent the theoretical values. Plots are the observed data and the mean \pm S.E.M. (n = 3-4). LOS = losartan, HCTZ = hydrochlorothiazide.



Figure 1-8. Relationship between RE_{max} value and the dose of hydrochlorothiazide for hypotensive effect after administration of losartan with hydrochlorothiazide. Solid line represents a regression line. Plots represent the model-calculated value.

3-5 モデルの堅牢性評価

構築した PK-PD モデルの堅牢性を確認するため、これまでに評価していない用量である losartan 5 mg/kg 及び hydrochlorothiazide 8 mg/kg を併用投与した時の SBP の変化を予測可 能か検証した. PK 及び PK-PD パラメータは Table 1-1 及び Table 1-2 の値を使用し、RE_{max} は Figure 1-8 の相関関係及び実際の投与量 (8 mg/kg) から算出した値 (19.09) を使用した. Figure 1-9 に予測値と実測値の比較を示す.構築した PK-PD モデルを用いて予測した SBP の 推移は実測値を適切に記述しており、検討した範囲の投与量における SBP の推移を予測でき る可能性が示された.



Figure 1-9. Comparison of the model-simulated SBP with the observed data after i.v. bolus administration of losartan 5 mg/kg with hydrochlorothiazide 8 mg/kg. The solid lines represent the simulated values and plots are the mean of observed data \pm S.E.M. (n = 3).

4. 考察

本章では、臨床で報告されている losartan 及び hydrochlorothiazide 単回及び併用投与時の 降圧効果の相乗効果を高血圧の病態モデルである SHR で確認するとともに、両薬物投与後の 体内動態解析を実施した.得られた薬物動態パラメータを用いて、血漿中濃度と相乗的な血圧 低下効果との関係を速度論的に解析するために薬力学マーカーである血漿レニン活性の変動 を考慮し、薬力学的相互作用をモデル化する方法について検討した.

まず losartan 及び hydrochlorothiazide を併用投与時の血漿中濃度推移を解析した結果, hydrochlorothiazide の薬物動態は単独投与時と変化しなかった一方 losartan の全身クリアラン スは単独投与時と比べて 25%低下することが明らかとなった. Losartan の責任代謝酵素は CYP2C9 であること,また投与量の 94%が糞中へ排泄されることが報告されており ²¹⁾, hydrochlorothiazide は未変化体のまま尿中へ排泄される ²⁵⁾ ことから, losartan と hydrochlorothiazide の併用投与によって薬物代謝を介した相互作用は生じないと考えられた. また, losartan と hydrochlorothiazide のタンパク結合率はそれぞれ 99%以上²⁶⁾ 及び 22%²⁷⁾ で あり, hydrochlorothiazide のタンパク結合率が低いことから,タンパク結合を介した相互作用の 可能性も低いと考えられた. SHR へ hydrochlorothiazide を 5 日間反復投与することにより尿量 が顕著に増加する報告があることから²⁸⁾, 尿中排泄の増加による体液量減少により losartan の 血漿中濃度を増加させた可能性が考えられた.

Losartan と hydrochlorothiazide を単独及び併用投与後の血圧を測定した結果, losartan と

hydrochlorothiazide を併用投与することで相乗的な血圧低下効果が認められた.上述の通り, 母集団薬物動態解析の結果から losartan の全身クリアランスは 25%小さくなることが明らかとな ったが,最大血漿中濃度は変化しなかったことから losartan と hydrochlorothiazide 併用投与に よる薬効の増強は薬物動態学的相互作用によるものではないと考えられた.また,血圧低下効 果の増強は losartan 及び hydrochlorothiazide の投与量に依存していたことから,相乗的な血圧 低下効果は薬力学的相互作用によるものと考えられた.この相乗効果を考察するため, losartan 及び hydrochlorothiazide の作用メカニズムを調査し, Figure 1-10 にまとめた.



Figure 1-10. Effect of losartan and hydrochlorothiazide in the renin-angiotensin system cascade.

Losartan はアンジオテンシンII (AngII) の AngI受容体 (AT1R) への作用を阻害するが, そ の結果として AngIIが血管拡張作用を有する AngII受容体 (AT2R) に作用し, 血圧を低下させ る²⁶⁾. また, AT1R を阻害することによりレニン-アンジオテンシン系に対する負のフィードバック が抑制されることによって血漿レニンの活性が増加し, AngI, AngII及び Ang (1-7) が増加する. ラットに losartan の類薬であるバルサルタンを投与後に血漿レニン活性と AngIIが持続的に増加 すること, Ang (1-7) は Mas 受容体に結合することで一酸化窒素を放出し血圧を低下させるこ と, 及びラットへ hydrochlorothiazide を 100 mg/kg を経口投与し, 翌日に hydrochlorothiazide を 10 mg/kg で経口投与したとき, 血漿レニンの活性が増加することが報告されている²⁸⁾. 本試験 においても血漿レニンの活性は losartan 単回投与後 72 時間まで持続的に増加し, hydrochlorothiazide と併用投与で相乗的な増加を示したことから, 血漿レニン活性は相乗的な 血圧低下効果を説明する上で有用な薬理学的バイオマーカーと考えられた.

以上の結果を踏まえ,相乗的な血圧低下効果を解析するため,血漿レニンの活性の活性化 を組み込んだ PK-PD モデルの構築を検討した.これまでに薬力学的相互作用を PK-PD モデ ルに組み込んだ報告がなく,薬物動態学的相互作用が小さかったこと及び hydrochlorothiazide 単独投与では血漿レニン活性の上昇及び血圧低下効果が認められなかったことに基づき, PK モデルは losartan のモデルのみを使用し,血漿レニンの活性の活性化に対する最大効果 (RE_{max})を hydrochlorothiazide の投与量に応じて推定できるように設定した.また, losartan の 血漿中濃度推移に対して血漿レニンの活性化に時間的な遅れが認められたことから,この遅れ を説明するために X1 及び X2 で表す "delay compartment" を挿入した.このコンパートメント は losartan の活性代謝物 (E-3174)を記述している可能性が考えられたことから,論文値²⁹⁾を 参考に E-3174 の薬物動態パラメータを推定した.モデル構造及び実測値と予測値の比較を Figure 1-11 に,解析結果から得られた薬物動態パラメータを Table 1-3 に示す.推定値は今回 得られたパラメータと異なる値であり,X1 及び X2 は E-3174 だけではなく,その他の代謝物や 内因性物質の包括的な変化を示している可能性が考えられた.



Figure 1-11. Pharmacokinetic model for E-3174 after i.v. bolus administration of losartan [A] and the time-course profile of plasma E-3174 concentration[B]. M1, M2: the central and peripheral compartment for E-3174; Mk_{12} , Mk_{21} , a, Mk_{out} : the first-order constant. LOS = losartan.

Parameters		Estimates
А	(min ⁻¹)	0.0228 ± 0.0016
Mk ₁₂	(min ⁻¹)	0.0110 ± 0.00285
Mk ₂₁	(min ⁻¹)	0.00590 ± 0.00211
Mkout	(min ⁻¹)	0.0219 ± 0.00205

Table1-3. Pharmacodynamic parameter estimates for E-3174 after i.v. bolus administration of Losartan in rats

Data represents the computer-fitted value \pm SD.

血漿レニンの活性の変化と血圧推移の間にも時間遅れが認められたことから,血漿レニンの活性と血圧低下効果の関係を解析するため,さらに薬効コンパートメントを追加することで相乗的な血圧低下効果を表した.血漿レニンの活性は血漿中 AngII及び Ang (1-7) 濃度を増加させ,これらが AT₂R 及び Mas 受容体に作用し血圧低下効果を示すことから,この薬効コンパートメントはこれらの作用にかかる時間を説明していると考えられた.

以上より, losartan と hydrochlorothiazide 併用時の相乗的な血圧低下効果について血漿レニ ン活性の変動で説明が可能であることを PK-PD モデルを用いて速度論的に明らかにした.ま た, Figure 1-8 に示すように, hydrochlorothiazide の投与量と推定された REmax に相関関係が 認められたことから,両薬物を併用投与した時の血漿レニンの活性の変動についても両薬物の 投与量から予測することが可能であった.したがって,相乗効果をPK-PDモデル解析に組み込 む際,作用メカニズムから定量可能なバイオマーカーの影響を考慮することにより相互作用を 評価することが可能となることを明らかにした.また,今回モデルには臨床現場で評価可能な血 漿レニンの活性をモデルに組み込み, hydrochlorothiazide の投与量との関係を明らかにするこ とで両薬物併用投与時の薬効を予測したが、実際に臨床現場で ARB とチアジド系利尿薬を併 用するときに血漿レニン活性とチアジド系利尿薬の投与量との相関関係を明らかにすることが できれば,併用するチアジド系利尿薬の投与量や,両薬物の合剤の研究開発における薬物の 投与量の設定に非常に具体的で応用可能な情報を提供するものと考えられる.また,一般に治 療薬物モニタリング (TDM) の対象薬剤でない限り,臨床現場で各薬剤の血漿中濃度が測定 されることはないが,血漿レニン活性のように臨床現場で評価可能な薬力学マーカーと有効性 を定量的に関係付けることで、患者毎に血漿レニン活性に基づく用量調節や薬剤変更の判断 にも活用できる可能性が考えられた.

5. 小括

本章では高血圧治療薬である losartan 及び hydrochlorothiazide を併用投与した際の相乗的 な血圧低下効果を定量的に説明する PK-PD モデルの構築について検討した.この相乗効果 は主に血漿レニン活性を介した薬力学的な相互作用に由来すると考えられ、血漿レニン活性 の変化を説明するために hydrochlorothiazide の投与量と血漿レニン活性の REmax の関係を明 らかにすることで、様々な投与量における血圧低下効果を予測できる可能性を示した.本検討 によって血漿レニンの活性の程度に応じて降圧効果を説明できることが明らかになったことから、 薬力学マーカーとして血漿レニン活性を評価することで両薬物の相乗効果を予測することが可 能であり、臨床現場において血漿レニン活性を評価する有用性が示唆された.以上から、本研 究で構築した PK-PD モデルは臨床で認められている相互作用を定量的に予測可能であり、最 適投与計画立案に有用であると考えられた.

第2章

第2世代アンチセンス核酸を投与した時の持続的な血漿中総コレステロールの

低下効果に対する PK-PD モデルを用いた定量的評価及び考察

1. 緒言

前章では、相乗的な薬理効果を説明するためには薬物の体内動態及び薬効に加えて薬力 学マーカーの変動を考察し、メカニズムに基づく PK-PD モデルを構築することで様々な投与条 件での予測につなげられることを示した.本章ではさらに、近年新規創薬モダリティの1種として 注目されている核酸医薬品のうち、アンチセンス核酸 (ASO) 投与後の持続的な薬効について バイオマーカーを活用した PK-PD モデルを用いて説明可能か検討した.

以下に本章で使用する ASO の一般的な構造的特徴,作用メカニズム及び薬物動態学的特徴を記述する.

構造的特徴及び作用メカニズム

ASO は、一般的に 7-30 個のヌクレオチドを有する合成一本鎖ヌクレオチドポリマーから構成 されており、Watson-Crick 塩基対の形成を介して標的 RNA と特異的に結合することで疾患関 連タンパク質の産生を阻害する ³⁰⁾. 特に第 2 世代 ASO は、末端に人工核酸であるロック核酸 (Locked nucleic acid: LNA)を導入することで生物学的安定性が向上し、標的組織でより長い 半減期が得られるようになった. また、翻訳阻害への主要経路として内因性リボヌクレアーゼ H (RNase H)を動員することにより標的 RNA の切断を効率的に誘導し、副作用が少なく強力な 薬理作用を示す ^{30,31)}.

薬物動態学的特徴

第2世代ASOは、皮下投与によって速やかに吸収され、最高血漿中濃度 (Cmax) 到達後、 多相性の消失を示し、非常に低い血漿中濃度からなる緩徐な消失相を示すことが知られてい る.また、反復投与による蓄積はほとんど認められない.全身循環に到達した後、エンドサイト ーシスを介して肝臓や腎臓などの組織にほぼ完全に取り込まれ持続的な曝露が認められる. 組織中のヌクレアーゼによって緩やかに代謝され、主に尿中より排泄される^{30,32)}.

24

ASO は、標的分子に対する選択性の高さや安全性が比較的良好であることから近年医薬品 としての研究や開発が盛んに実施されている.しかしながら、上述した通り、第2世代 ASO は 血漿中濃度が非常に低く定量自体も困難であることから, 血漿中濃度に基づいて有効性を推 定することは困難であり、PK-PD 解析に関する報告は組織中 ASO 濃度と標的組織の mRNA の減少との相関関係を評価した報告のみであった^{32,33)}.しかしながら、医薬品の開発のために は、臨床試験等で評価可能な血漿中濃度と有効性又は代替マーカーに関するバイオマーカー 応答を, 組織中 ASO 濃度及び薬力学マーカーとなり得る標的 RNA の変化を含めて定量的に 関係付けることが有用であると考えられた. そこで本研究では, モデル薬物として ASO 研究に 広く使用されている,コレステロール代謝に重要な肝臓のアポリポプロテイン B (Apo-B) の mRNA を標的とし、血漿中のコレステロールを低下させる作用を持つ ASO を使用した³⁰⁾. コレ ステロールを低下させる作用を有する薬物の真のエンドポイントは脳梗塞等の発症と考えられる が、少数の動物で臨床における真のエンドポイントを評価することは困難であることから、代替 マーカーとして臨床現場で評価されている総コレステロール濃度を選択した.したがって,本章 では、マウスへ ASO を単回又は反復皮下投与したときの、PK の指標として血漿中及び肝臓中 ASO 濃度, 薬力学マーカーとして肝臓中 Apo-B mRNA 量, 代替マーカーとして血漿中総コレ ステロール濃度をそれぞれ測定し、血漿中濃度から肝臓中濃度、薬力学マーカー推移及び代 替マーカー推移までを説明可能な PK-PD モデルの構築を検討した.

2. 実験方法

2-1 実験材料

本研究において使用した ASO は GeneDesign 社 (Osaka, Japan) より購入した. 本アンチセンスの配列は 5'-GCattggtatTCA-3'(LNA[大文字] 及び DNA[小文字] を含むギャップマーオリゴヌクレオチド, 分子量 4324.6) であり, アポリポプロテイン B(Apo-B)mRNA に高い親和性を有する. 生理食塩水は大塚製薬株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した. RNAlater はQIAGEN 社 (Hilden, Germany) より購入し, TE 緩衝液 (pH 8.0) は和光純薬株式会社 (Osaka, Japan) から購入した. その他の試薬及び溶媒は市販の特級以上の製品を使用した.

2-2 ASO の薬物動態及び薬力学的評価

2-2-1 実験動物

実験には7週齢雌性マウス (C57BL/6J, 日本クレア社, Tokyo, Japan) を使用した.

2-2-2 投与液の調製

ASO の投与液は, 生理食塩液に溶解し調製した.

2-2-3 ASO の投与試験及び検体の採取

ASO を単回 (1~10 mg/kg) 又は反復 (5 mg/kg/week を 4 週間) で皮下投与した. 単回投 与後 0.083, 0.25, 0.5, 1, 4, 8, 24, 72, 168, 336, 504 及び 672 時間に各マウスの下大静脈より ヘパリン及び EDTA-2K を含む注射筒を用いて血液を採取後速やかに氷冷チューブに移し, 1,600g で 10 分間遠心分離し, 血漿を得た. ASO の肝臓中濃度及び肝臓中の mRNA を評価 するため, 採血を実施したマウスから肝臓を採取した. また, 反復投与開始後 168, 336, 504 及 び 672 時間に各マウスの下大静脈よりヘパリン及び EDTA-2K を含む注射筒を用いて血液を採 取後速やかに氷冷チューブに移し, 1,600g で 10 分間遠心分離し, 血漿を得た. ASO の肝臓 中濃度及び肝臓中の mRNA を評価するため, 採血を実施したマウスから肝臓を採取した. 血 漿及び肝臓検体はいずれも-80℃で保管した.

2-3 ASO 投与後の濃度及びバイオマーカー測定

2-3-1 血漿及び肝臓中 ASO 濃度測定

血漿及び肝臓中 ASO は, 既報³⁴⁾ に基づき, LC-MS/MS を用いて測定した. 肝臓検体は抽 出緩衝液 (0.5% Nonidet P-40, 25 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 100 mM sodium chloride, 25 mM tris hydroxymethyl aminomethane, 0.5 mg/mL proteinase K, pH 8.0) を添加し た後ホモジネート後, 37°Cで 3 時間インキュベートし, 抽出した. 血漿及び肝臓ホモジネート検 体は液-液抽出法を用いて抽出後, 固相抽出した. 抽出液は蒸発乾固したのち, 10 μ M H₃PO₄ を含む TE 緩衝液:メタノール= 9:1 の溶液に再溶解し, ろ過後 LC-MS/MS に注入した. 測定 条件は以下の通りである.

System: API5000 (SCIEX, Foster City, CA).

Column: ACQUITY BEH (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm, Waters Inc., Milford, MA, USA)

Mobile phase A: 400 mM Hexafluoro-2-propanol/15 mM triethylamine in H₂O

Mobile phase B: mobile phase A/methanol/acetonitrile (2/1/1)

Flow rate: 0.2 mL/min (gradient)

Ionization: ESI negative

Column temperature: 60°C

Detection: 599.7 m/z > 94.9 m/z

2-3-2 肝臓中 mRNA 測定

採取した肝臓に含まれる全ての RNA を RNeasy 96 Universal Tissue Kit (QIAGEN) を用い て抽出した. 全 RNA のうち 1 g の RNA を SuperScriptTM III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, Camarillo, CA, USA) を用いて cDNA に変換した. 定量的 PCR は Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio, Otsu, Japan) を用いて実施した. Apo-B mRNA 量は GAPDH 及びコントロール群を用いて補正した.

2-3-3 血漿中総コレステロール測定

血漿検体を用いて血漿中総コレステロールを測定した.血漿中総コレステロールはコレステ ロール E-テストワコー (和光純薬株式会社, Osaka, Japan)を用いて測定した.

2-4 データ解析

モデルに依存しない薬物動態パラメータ及びモデルパラメータは WinNonlin (version 5.0.1, Pharsight 社) を用いて推定した. 反復投与後のシミュレーションは NONMEM version 7.2.0 (ICON Development Solutions, Ellicott City, MD, USA)²³⁾ を用いて実施した. NONMEM を用 いて解析を実施したが,使用用途はシミュレーションであり,個体間変動や個体内変動等は考慮しなかった.

2-5 PK-PD モデリング

Figure 2-1 に ASO 投与後の血漿中濃度, 肝臓中濃度, 肝臓中 Apo-B mRNA 及び血漿中総コレステロールの変化を表す PK-PD モデルを示す.



Figure 2-1. PK-PD model for the reduction of hepatic Apo-B mRNA and plasma total cholesterol by ASO.

血漿中 ASO 濃度は2相性の消失を示したことから,血漿中 ASO 濃度は以下に示す 2-コン パートメントモデルを用いて解析した.

$$dA_{sc}/dt = -ka \cdot A_{sc} \tag{2-1}$$

$$dA_{pla}/dt = ka \cdot A_{sc} - k_{12,P} \cdot A_{pla} + k_{21,P} \cdot A_{per} - ke_p \cdot A_{pla}$$
(2-2)
$$dA_{per}/dt = k_{12,P} \cdot A_{pla} - k_{21,P} \cdot A_{per}$$
(2-3)

$$C_{pla} = A_{pla} / V d_p \tag{2-4}$$

ここで、A_{sc}、A_{pla}及び A_{per} は皮下、血漿及び末梢コンパートメントに含まれる ASO 量 (mg/kg)、 Vd_p は血漿コンパートメントの ASO の分布容積 (L/kg)、ka 及び ke_p はそれぞれ吸収及び消失 に関する 1 次速度定数 (/hr)、k_{12,P} 及び k_{21,P} は血漿から末梢及び末梢から血漿コンパートメン トに移行する 1 次速度定数 (/hr)、C_{pla} は ASO の血漿中濃度 (µg/mL) を示す. なお、ASO は 皮下投与後、良好に吸収されると報告されていることから³²⁾、バイオアベイラビリティは 1 と仮定 した.

肝臓中 ASO 濃度は, 肝臓中の ASO の挙動を適切に解析するため, "sub-compartment"を含む以下のモデルを用いて記述した.

$$dA_{liv}/dt = ke_{p} \cdot A_{pla} - k_{12,L} \cdot A_{liv} + k_{21,L} \cdot A_{sub} - ke_{L} \cdot A_{liv}$$
(2-5)
$$dA_{sub}/dt = k_{12,L} \cdot A_{liv} - k_{21,L} \cdot A_{sub}$$
(2-6)

$$C_{liv} = A_{liv} / V d_L / F \tag{2-7}$$

ここで、Aliv 及び Asub は肝臓コンパートメント及び "sub-compartment" 中の ASO 量 (mg/kg), VdL は肝臓コンパートメント中の分布容積 (kg of liver/kg of body weight), F は血漿コンパートメ ントから肝臓コンパートメントに分布する割合, k_{12,L} 及び k_{21,L} は肝臓から "sub-compartment" 及び "sub-compartment" から肝臓へ ASO が移行する 1 次速度定数 (/hr), ke_L は肝臓コンパ ートメントからの消失速度定数(/hr), C_{liv} は肝臓コンパートメント中の ASO 濃度 (µg/g of liver) を示す. このとき, ASO は血漿から速やかに消失したこと及び ASO の関する詳細な分布に関 する情報が得られなかったことから, 血漿から消失した ASO は全て肝臓へ一方向で移行し, 肝 臓から緩やかに代謝を受けると仮定した.

肝臓中 Apo-B mRNA の変化は, mRNA の生合成を示す 0 次速度定数 (k_{in,mRNA}, % of control/hr) 及び mRNA の分解を示す 1 次速度定数 (k_{out,mRNA}, /hr) を用いて表した. "Sub-compartment" 中のASO 量とk_{out,mRNA}の関係は以下に示す間接反応モデルで記述した.

$$dR_{mRNA}/dt = k_{in,mRNA} - k_{out,mRNA} \cdot S(t) \cdot R_{mRNA}$$
(2-8)

$$S(t) = 1 + S \max_{mRNA} \cdot A_{sub} / (SC50_{mRNA} + A_{sub})$$
(2-9)

$$S \max_{mRNA} = R_{mRNA,0} / R_{mRNA,ss} - 1$$
(2-10)

ここで、 R_{mRNA} は Apo-B mRNA の変化を表すコンパートメント中の mRNA 量 (% of control)、 Smax_{mRNA}は mRNA の最大低下効果、SC50_{mRNA}は Smax_{mRNA}を 50%低下するために必要な "sub-compartment"中 ASO の濃度 (mg/kg)、 $R_{mRNA,0}$ は Apo-B mRNA の初期レベル (% of control) 及び $R_{mRNA,ss}$ は定常状態における Apo-B mRNA の最大低下能力 (% of control) を 示す. また、式 (2-8) より、ASO 投与前では、 $k_{in,mRNA} = k_{out,mRNA} \cdot R_{mRNA,0}$ が成立する. 間接反 応モデルでは、Smax_{mRNA} は式 (2-10) で計算されるが、推定パラメータ数を減らすため、 Smax_{mRNA}は最大効果を示す1に固定した. なお、Smax_{mRNA}は、変化の大きさを視覚的に理解 するため、以降の図では% of control として投与前の値からの百分率として記載した.

Apo-BmRNA は肝臓における超低密度リポタンパク質 (very low-density lipoprotein: VLDL) 産生に寄与することから, VLDL の変化は以下の間接反応モデルで記述した.

$$dR_{VLDL}/dt = k_{in,VLDL} \cdot R_{mRNA}/R_{mRNA,0} - k_{out,VLDL} \cdot R_{VLDL}$$
(2-11)

$$E_{cho} = E_{cho,0} - Imax_{cho} \cdot \left(R_{VLDL,0} - R_{VLDL}\right)^{\gamma} / (IC50_{Cho}^{\gamma} + \left(R_{VLDL,0} - R_{VLDL}\right)^{\gamma})$$
(2-12)

ここで、R_{VLDL}はVLDLコンパートメント中のVLDL値(% of control)、R_{VLDL,0}はVLDLの初期レ ベル(% of control)、Imax_{Cho}はVLDLの最大総コレステロール低下効果(mg/dL)、IC50_{Cho}は Imax_{Cho}の50%低下に必要なR_{VLDL}(% of control)、E_{cho}は血漿中総コレステロールレベル (mg/dL) E_{cho,0}は血漿総コレステロールの初期レベル(mg/dL)及びγはヒル係数を示す.推定 するパラメータを減らすため、Imax_{Cho}は血漿総コレステロールレベルの初期値(64.9 mg/dL) に固定した.また、式(2-11)より、ASO投与前ではk_{in,VLDL} = k_{out,VLDL}・R_{VLDL,0}が成立する.さら にVLDLの変化は、VLDLの生合成を表す0次速度定数(k_{in,VLDL},% of control/hr)及びVLDL の分解を表す1次速度定数(k_{out,VLDL},/hr)を用いて記述した.

3. 結果

3-1 血漿中及び肝臓中 ASO 濃度の薬物動態解析

Figure 2-2 に ASO を 1~10 mg/kg で皮下投与した時の血漿中及び肝臓中 ASO 濃度を示 す. これまでの報告と同様に ASO は投与後速やかに吸収され, 血漿から2 相性の消失を示し, 投与 24 時間後には定量下限以下であった. また, 血漿中濃度推移に対するモデルに依存しな い薬物動態パラメータ及びモデルパラメータの解析結果を Table 2-1 に示す. 1~10 mg/kg 投 与時の血漿からの消失半減期は 1.15 時間, 3.05 時間及び 2.46 時間であり, T_{max}は 0.25 時間, 0.50 時間及び 0.25 時間であった. 肝臓中 ASO 濃度も同様に二相性の消失を示し, 肝臓から の消失半減期は 81.2 時間, 183 時間及び 173 時間, T_{max} は 8 時間, 8 時間及び 4 時間であっ た.



Figure 2-2. ASO concentrations in plasma (a) and liver (b) after subcutaneous administration of ASO. Each observed value represents the mean \pm SD (n = 3) at 1 mg/kg (diamonds), 5 mg/kg (triangles) and 10 mg/kg (squares) and each predicted value represents the line at 1 mg/kg (solid), 5 mg/kg (dashed) and 10 mg/kg (gray).

Matrix	Dose (mg/kg)	t _{1/2} (hr)	T _{max} (hr)	C _{max} *	AUC**
	1	1.15	0.25	0.358	0.740
Plasma	5	3.05	0.50	2.09	3.89
	10	2.46	0.25	4.48	8.43
	1	81.2	8	1.60	128
Liver	5	183	8	7.33	671
	10	173	4	12.9	1506

Table 2-1. Non-compartmental analysis of ASO concentration versus time profiles in mice

*: μ g/mL for plasma concentration, μ g/g for hepatic concentration.

**: $hr \cdot \mu g/mL$ for plasma, $hr \cdot \mu g/g$ for liver.

(各時点3点の平均値に基づくノンコンパートメント解析の結果)

血漿中及び肝臓中の AUC は用量に比例して増加し, 消失相が緩やかであったことから, 血 漿及び肝臓中 ASO の記述にはいずれも線形 2-コンパートメントモデルを選択した. 血漿中及 び肝臓中 ASO 濃度に対して解析から得られた薬物動態パラメータを Table 2-2 に示す. ka が (8.5 /hr) と大きな値を示し, k_{12,p} 及び k_{21,p} の変動係数 (CV%) がわずかに大きかったものの, パラメータ推定値から血漿中及び肝臓中の ASO 濃度を適切に記述することが可能であった (Figure 2-2).

Parameters	Description	Estimates	CV (%)
ka (/hr)	Absorption rate constant	8.5	27
k _{12,P} (/hr)	First-order rate constant from plasma to peripheral compartment	0.18	55
k _{21,P} (/hr)	First-order rate constant from peripheral to plasma compartment	0.22	117
ke _P (/hr)	Elimination rate constant plasma compartmen	0.86	25
Vd _P (L/kg)	Distribution volume of ASO in the plasma compartment	1.8	16
k _{12,L} (/hr)	First-order rate constant from the liver to the sub-compartment	0.012	38
k _{21,L} (/hr)	First-order rate constant from the sub- compartment to the liver	0.014	49
ke _L (/hr)	Elimination rate constant from liver compartment	0.012	8.5
Vd _L /F (kg of liver/kg of body weight)	Distribution volume of ASO in the liver compartment	0.66	4.6

Table 2-2. Pharmacokinetic parameters estimate after subcutaneous administration of ASO in mice

CV = coefficient of variation.

3-2 肝臓中 Apo-B mRNA 及び血漿総コレステロールの PK-PD 解析

薬力学マーカーである肝臓の Apo-B mRNA は投与 4-8 時間後に用量依存的に減少し始め,
投与 24~72 時間後に最大低下効果を示した (Figure 2-3 [a], [b]). つまり, 肝臓中の ASO 濃度と Apo-B mRNA 量の変化にタイムラグが認められた. そこで,この Apo-B mRNA の変化を記述するために間接反応モデルを挿入し (Figure 2-1), 解析を実施した. 結果を Figure 2-3 (a)
及び Figure 2-3 (b) に, 薬力学的パラメータを Table 2-3 に示す. 構築したモデルを用いることで, ASO 投与後の初期相の変化も含め, Apo-B mRNA の変動を適切に記述可能であった.

続いて, Apo-B mRNA の低下によって得られる, 代替マーカーとして血漿総コレステロール 濃度推移を評価した. ASO を 1 mg/kg で投与したとき, 血漿総コレステロール濃度は投与前と 比べて最大 20%低下した程度であったが, ASO を 5 及び 10 mg/kg で投与したとき, 血漿総コ レステロール濃度は大きく低下し (ベースラインから最大 60-80%の低下), その効果は投与開 始から 672 時間持続した. いずれの投与量においても血漿総コレステロールは投与後 72 時間 に最大低下効果を示し、Apo-B mRNA の変化と比べてやや遅れた応答を示した. したがって、 血漿総コレステロール濃度は、Apo-B タンパクを有する VLDL の変化量を記述するコンパート メントを含む間接反応モデルで表した. 解析結果を Figure 2-3 (c) 及び Figure 2-3 (d) に、薬 力学的パラメータを Table 2-3 に示す. 推定されたパラメータを用いて ASO 投与後の血漿中総 コレステロール推移を適切に記述できたことから、構築した PK-PD モデルは、ASO 投与後の血 漿中 ASO 濃度から、持続的な血漿総コレステロール推移の関係を適切に説明できるものと考 えられた.

Table 2-3. Pharmacodynamic parameters estimate for the reduction of hepatic Apo-B mRNA expression and plasma total cholesterol concentration after subcutaneous administration of ASO in mice.

Parameters	Description	Estimates	CV (%)
k _{out,mRNA} (/hr)	Degradation rate constant of mRNA	0.067	22
$SC50_{mRNA}$	ASO concentration in the sub compartment	17.2	0.0
(mg/kg)	reducing 50% of Smax _{mRNA}	17.5	9.9
$Smax_{mRNA}(\%)$	Maximum reducing effect of the mRNA	100	Fixed
k _{out,VLDL} (/hr)	Degradation rate constant of VLDL	0.16	30
$IC50_{cho}$ (% of	R reducing 50% of Imax	72	2 1
control)	KVLDL feducing 50% of miax _{cho}	75	5.1
Imax _{cho}	Maximum hypocholostarol offact of VI DI	64.0	Fired
(mg/dL)	Maximum hypocholesteror effect of VLDL	04.9	гіхец
γ	Hill function	3.6	14

 $\overline{CV} = \overline{coefficient of variation.}$



Figure 2-3. Changes in hepatic Apo-B mRNA (a, b) and plasma total cholesterol (c, d) after administration of ASO. Each observed value represents the mean \pm SD (n = 3) at control (circles), 1 mg/kg (diamonds), 5 mg/kg (triangles) and 10 mg/kg (squares) and each predicted value represents the line at control (dotted 0 h), 1 mg/kg (solid), 5 mg/kg (dashed) and 10 mg/kg (gray). (b) and (d) shows a magnification for the early phase of (a) and (c).

3-3 PK-PD モデルの評価

血漿中及び肝臓中 ASO 濃度, 肝臓中 Apo-B mRNA 変化率及び血漿総コレステロール濃度の実測値と,構築した PK-PD モデルから得られた予測値の相関解析を Figure 2-4 に示す. いずれも実測値と予測値の間に大きな乖離は認められず,構築した PK-PD モデルによって実測値を適切に記述できた.



Figure 2-4. Correlation analysis for the observed and predicted plasma ASO concentration (a), hepatic ASO concentration (b), hepatic Apo-B mRNA (c), and plasma total cholesterol (d). The dashed lines are lines of identity (y = x).

さらに、構築した PK-PD モデルの堅牢性を確認するため、ASO を 5 mg/kg/week で 4 週間反 復皮下投与した時の肝臓中 ASO 濃度, 肝臓中 Apo-B mRNA 変化率及び血漿総コレステロー ル濃度の経時変化について、構築した PK-PD モデルから計算された予測値と実測値を比較し た (Figure 2-5). その結果, 構築した PK-PD モデルから計算された予測値は実測値を適切に 記述可能であった. したがって、構築した PK-PD モデルを使用することにより、マウスにおいて、 様々な投与条件における薬効をシミュレーションできることから、用量や投与間隔などの試験条 件の最適化にも有用となる可能性が示された.



Figure 2-5. Comparison of simulated values (solid line) with the observed values (triangles) of hepatic ASO concentration, Apo-B mRNA expression and plasma total cholesterol concentration after repeated subcutaneous administration of ASO (5 mg/kg/week). Each observed value represents the mean \pm SD (n = 3) at control (circles) and 5 mg/kg (triangles). Dotted line shows control (at t = 0 h).

4. 考察

本試験では第2世代ASO投与後の肝臓中ASO濃度,薬力学マーカーとして肝臓中Apo-B mRNA発現量及び代替マーカーとして血漿中総コレステロール濃度の変化を血漿中ASO濃 度から予測可能なPK-PDモデルを構築した.また,ASO反復投与後の薬効をシミュレーション し、実測値と比較することでモデルの妥当性を証明した.

まず今回使用した ASO の薬物動態を評価した結果,これまでの報告^{30,32)} と同様に,皮下 投与後速やかにかつ良好に吸収され, C_{max} に達した後,血漿中濃度は速やかに消失した.ま た,肝臓への持続的な曝露が確認できた. PK 解析を実施した結果,血漿中及び肝臓中 ASO 濃度推移は 2-コンパートメントモデルで記述可能であった. 得られた PK パラメータについて, 皮下投与後の吸収速度定数 (ka) は相対的に高い値を示したが (8.5 /hr), これは ASO が高 い水溶性かつ代謝的に安定であり、他の ASO でも同様に高い結果が得られている³⁵⁾. また、 血漿からの消失速度定数 (ke_p) の値が肝臓からの消失速度定数 (ke_l) の値と比べて約 72 倍 高かったが、ノンコンパートメント解析でも同様に肝臓中消失半減期が血漿中半減期と比べて 60-71 倍高かったことから、推定されたパラメータは適切であると考えられた. また、肝臓中 ASO 濃度推移が 2 相性を示したことから肝臓中 ASO 濃度解析時に "sub-compartment" を仮定す ることで適切に解析を実施できたが、この "sub-compartment" 中の薬物が肝臓の核内の分布 を表し、"sub-compartment" 中の ASO が mRNA とハイブリダイズし RNaseH による mRNA 分 解を促進すると仮定した. また、肝臓コンパートメントにおける ASO の分布容積は、肝臓容積を 血漿コンパートメントから肝臓コンパートメントにおける ASO の分布容積は、肝臓容積を 血漿コンパートメントから肝臓コンパートメントへの ASO の分布比で調整した値である Vd_L/F で 記述した. F によって調整された Vd_L の値 (投与量の約 10%) がマウスの生理的肝臓容積 (0.065 L/kg) と類似していた³⁶⁾ ことから、F を考慮したパラメータとして算出することが適切であ ると考えられた.

続いて、薬力学マーカーである肝臓中 Apo-B mRNA 変化率は、"sub-compartment" 中 ASO 濃度を用いた間接反応モデルによって良好に記述可能であった.本研究では、翻訳阻害の主 要経路として RNaseH の動員による標的 RNA の切断を誘導する ASO を使用したことから、 mRNA の分解を促進する間接反応モデルが適していると考えた. 代替マーカーである血漿中 総コレステロール濃度の推移についても、Apo-B mRNA の変化とのタイムラグを間接反応モデ ルで記述するため、VLDL コンパートメントを仮定した追加のコンパートメントを挿入した. Apo-B は肝臓で VLDL の産生に寄与しているため、その減少は VLDL 産生抑制及び LDL 低下を引 き起こし、最終的に血漿総コレステロール濃度を低下させることから、得られた Apo-B mRNA 変 化及び血漿中コレステロール濃度のタイムラグは、このような血漿中総コレステロールの変化の 過程を示している可能性が考えられた. 解析から IC50choの値は 73%と推定され、Apo-B mRNA 発現が 100%低下し、VLDL 量が 0 になったとしても、式(2-12)から血漿総コレステロールは 0 になり得ないことから、今回使用した ASO 投与における Apo-B mRNA 阻害によって血漿総コ レステロールレベルは完全に 0 にならないことが示唆された.

構築した PK-PD モデルの堅牢性を確認するため,反復投与後の肝臓中 ASO 濃度, 肝臓中 Apo-B mRNA 変化量及び血漿中総コレステロール濃度を予測した結果は,いずれの指標についても実測値をうまく記述することが可能であった (Figure 2-5). また,本モデルは反復投与後の薬理作用を予測できることを示すことができた.一般的に肝臓を標的とする ASO の薬物動態 特性や薬理学的な特性は ASO 間で類似していることが報告されていることから,今回構築した PK-PD モデルは,様々な ASO に対しても活用できる可能性が考えられた.

5. 小括

以上, ASO 投与後の血漿中濃度から薬力学マーカー及び代替マーカー変動までを予測可 能な PK-PD モデルの構築に成功し,単回投与時の血漿中濃度,肝臓中濃度,肝臓中 mRNA 変化量及び血漿中総コレステロールの変化を記述可能であった. ASO は投与後速やかに血漿 中から消失する一方,持続的な有効性を示すことが知られていたが,投与から治療効果を示す プロセスに関与するバイオマーカーの変動まで PK-PD モデルに組み込むことの有用性を示し た.また,反復投与時の予測も可能であったことから,単回投与における薬物動態を評価するこ とにより,反復投与評価の実施判断や最適な投与条件の設定に有用であると考えられた. 非臨 床試験では,臨床試験と異なり,組織中の濃度や PoM を評価可能であるため,標的組織にお ける曝露と薬効との関係を評価する報告が多かったが,これらの情報に加えて,血漿中濃度及 び治療学的アウトプットを適切にモデル化することによって,核酸医薬品においても臨床で認め られる課題について解決可能になると考えられた.また,本研究を活用し,ヒトにおける血漿中 濃度と肝臓中濃度の関係を定量的に解析することにより,血漿中濃度に基づく有効性の評価 に繋がるものと期待できる.さらに,ASO は薬物動態や薬効メカニズムに共通点が多いことから, 本モデルを活用することにより様々な ASO の薬効解析及び予測に有用であると考えられた.

第3章

Methylphenidate を投与した時のドパミントランスポーター占有率と脳内ドパミン

変化率の推移に対する PK-PD モデルを用いた定量的評価

序論

これまでの検討から、低分子薬物及び核酸医薬品についてバイオマーカーを適切に評価し PK-PDモデルに組み込むことの有用性を提示した.特に第2章で記述した通り、一般的にASO の薬物動態特性や薬理学的な特性は ASO 間で類似していることから、構築した PK-PD モデ ルは様々な ASO に対しても活用できる可能性が考えられた.つまり、1 つの PK-PD モデルを構 築することで類似する薬理学的特性を有する化合物に広く適応できる可能性があることから、創 薬研究の初期段階から標的分子の妥当性の薬理評価に重要な化合物を用いて PK-PD モデ ルを構築すれば化合物のスクリーニングにも活用できると考えた.そこで、早期にバイオマーカ ーの推移を予測し開発候補化合物を選抜するための、in vitro 試験結果を活用したバイオマー カーの推移を予測する PK-PD モデルの構築を検討した.本研究では、創薬において成功確率 が非常に低いことが知られている中枢疾患のうち、注意欠如・多動症 (ADHD) を対象に、 PK-PD モデルを用いて創薬のスループット及び開発成功確率向上を目指した検討を実施した.

ADHD は小児期に最もよくみられる神経行動障害の1つである³⁷⁾. 治療薬として使用される methylphenidate は、主にドパミントランスポーター (DAT) 及びノルエピネフリントランスポータ ー (NET) を阻害し、線条体及び側坐核 (NAc) のドパミン遊離量を増加することが知られて いる³⁷⁾. 一般的に受容体に作用する薬剤は、薬力学マーカーである受容体占有率に基づいて 有効性が評価されており、特に速度論的には、標的受容体に対する kon 及び koff の影響を考慮 することが経時的な受容体占有率、ひいては経時的な有効性を適切に評価する上で重要であ ると考えられてきた³⁸⁻⁴⁰⁾. そこで第1節では、methylphenidate が阻害する DAT に対しても速度 論的な考察が必要ではないかと考え、kon 及び koff を評価するため、DAT 阻害作用に対する in vitro 蛍光に基づく取り込み試験のメカニズムに基づく数学モデルを用いた、DAT に対する methylphenidate 及び DAT 阻害作用を有する cocaine の kon 及び koff を算出する評価系の構築 を検討した. また、第2節では、得られた kon 及び koff の値を組み込み、薬力学マーカーとして DAT 占有率を活用し、ドパミン遊離量の推移に対する PK-PD モデルの構築を検討した.

第1節

In vitro 試験結果に基づく, methylphenidate 及び cocaine の DAT に対する kon 及び koff 算 出のための数理モデルの構築

1. 緒言

これまでに受容体占有率の推移は Emax モデルや kon 及び koffを用いた方法が提示されていた ³⁸⁻⁴⁰⁾. Emax モデルは,血漿中あるいは標的組織中の薬物濃度と受容体占有率を定量的に解析する方法であり,一般的に薬物の濃度と受容体占有率の推移に時間的な遅れが無い場合に使用されることが多い.一方, kon 及び koff を用いた方法は,受容体に対する速度論的なアプローチを用いた解析であることから,薬物の濃度と受容体占有率の推移に時間的な遅れがある場合に多く活用されている. 今回は, kon 及び koff 等の特性が異なる化合物においても DAT 占有率を適切に評価することを目的とするため,モデルに組み込む in vitro パラメータとして kon 及び koff が適切と考えられた. ただし,一般的にこれらは放射性同位体を用いた取り込み試験から算出されるが,放射性同位体の作成が必要等の理由から非常にスループットが悪いことから,従来とは異なるアプローチを用いた検討が必要であった. 一方, DAT に対する阻害評価として, in vitro 取り込み試験を用いて DAT に対する阻害定数 (Ki) を評価した実験が実施されており,その評価系から kon 及び koff を算出できないかを検討するため,試験系に基づく数理モデルの構築から検討した. さらに,これまでは受容体占有率の解析事例は報告されていたものの,トランスポーターに対する占有率の解析事例は報告されていなかった. 本試験では DAT に対する占有率の推移に着目し,その数理モデルの構築を検討した.

本試験で使用した,取り込み試験の概要は以下の通りである.

マスキング染料及び蛍光色素分子から構成される DAT 基質が, DAT を介して細胞内へ取り 込まれる際にマスキング染料が取り除かれ, 蛍光色素分子のみが細胞内へ移動する. したがっ て, 細胞内の蛍光色素分子から発する蛍光強度を評価することによって, DAT の取り込み能を 評価することが可能である (Figure 3-1).

2. 実験方法

2-1 実験材料

Methylphenidate は Sigma-Aldrich 社 (Tokyo, Japan)から, cocaine は武田薬品工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した. DAT の阻害評価に使用した fluorescent-based neurotransmitter transporter uptake assay dye は Molecular Devices 社 (Sunnyvale, USA) から

購入した. 生理食塩水は大塚製薬株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した. その他の試薬及 び溶媒は市販の特級以上の製品を使用した.

2-2 蛍光標識体を用いた in vitro 取り込み試験

Methylphenidate を評価緩衝液 (20 mM HEPES, 0.1%ウシ血清蛋白質を含む pH7.3 のハン クス平衡塩液) へ 0.0781~0.25 μ M で溶解した.取り込み試験は Neurotransmitter Transporter Uptake Assay Kit (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) を使用した.神経伝達物質アッセイ付 加色素試薬 (DAT 基質) を 20 mM HEPES を含むハンクス平衡塩溶液に溶解した. ヒト組換え DAT を安定的に導入したヒト胎児腎細胞 (HEK) 293 細胞を, 384 ウェル (Greiner Bio-One 社) に 1×10⁵ cells/mL (50 mL/well) の密度で播種し,一晩培養した.実験当日,洗浄器を用いて細 胞板から培養液を吸引した後, 20 mL のアッセイ緩衝液を添加した.プレートを蛍光画像プレー トリーダーに入れた後,細胞を室温で 5 分間インキュベートし,ベースラインを補正した.次に, 負緩衝液 10 mL 及び methylphenidate 溶液 10 mL を 384 ウェルプレート上で培養した細胞に 添加し,室温で 90 分間インキュベートした.添加開始から最初の 3 分間は 3 秒毎,残りの 87 分 間は 10 秒毎に蛍光強度を測定した (計 580 点/濃度).蛍光測定では,470~495 nm の波長の 光を用いて色素を励起し,515~575 nm で発光を収集した.また,DAT 阻害作用を有する cocaine⁴¹⁾ (0.313 および 0.625 mM) を用いて同様の実験も実施した.蛍光強度は平均値として 表した. **Figure 3-1** に in vitro 試験のスキームを示す.

2-3 データ解析

kon 及び koff は, 2.4 項に記載した数理モデルを基に WinNonlin (version 6.2.1, Pharsight 社) を用いて推定した.

2-4 In vitro 試験に基づく数理モデルの構築

数理モデルは, Figure 3-1 に示すスキームに基づいて構築した. 蛍光基質と蛍光強度の関係を式 (3-1) – (3-4)で記述した.

$$dC_{sub}/dt = -k'_{on} \cdot C_{sub} \cdot DAT_{free}$$
(3-1)

$$dC_{flu}/dt = k'_{on} \cdot C_{sub} \cdot DAT_{free}$$
(3-2)

$$dDAT_{free}/dt = -k_{on} \cdot C_{inh} \cdot DAT_{free} + k_{off} \cdot DAT_{bound}$$
(3-3)

 $dDAT_{bound}/dt = k_{on} \cdot C_{inh} \cdot DAT_{free} - k_{off} \cdot DAT_{bound}$ (3-4)

ここで、kon 及び koff は DAT 阻害剤の結合及び解離速度定数, k'on は蛍光物質の膜透過速度 定数, Csub は蛍光基質の濃度, Cfu は蛍光強度, DATfree は DAT の非結合分率, DATbound は DAT に対する DAT 阻害剤の結合分率, Cinh は DAT 阻害剤の濃度 (µM) を示す. DATfree 及 び DATboundの初期値はそれぞれ1及び0とした. また, モデル構築において, 蛍光強度とDAT を通過した蛍光基質の濃度は等しく, 定常状態においてすべての基質は DAT を介して取り込 まれる, つまり時間0における蛍光基質の濃度を最大蛍光強度と仮定した.

DAT 阻害剤を入れずに評価したとき (Figure 3-1 [a]) は, 蛍光基質は全ての DAT を経由し て取り込まれると考えられることから, DAT free を 1 に固定した. したがって, C_{sub} 及び C_{flu}の推移 は式 (3-1) 及び (3-2) で記述し, C_{sub} 及び k'on を蛍光強度の実測値から推定した.

DAT 阻害剤を添加したとき (Figure 3-1 [b]) は, 蛍光基質は阻害剤が結合していない DAT のみを通過し蛍光を発する. したがって, C_{sub}, C_{flu} 及び DAT_{bound} の変化を式 (3-1) – (3-4) で 記述した. DAT 阻害剤の k_{on} 及び k_{off}は蛍光強度の実測値から推定した.



Figure 3-1. Scheme of the in vitro study. The experiment in the absence [a] or presence [b] of methylphenidate. To observe the uptake of the DAT substrate, which is composed of masking dye and fluorophore, the masking dye is removed and only the fluorophore is transported into the cell. Therefore, the transport activity of the DAT substrate was investigated by measuring the fluorescence captured from the intracellular fluorophore. To measure fluorescence, the fluorophore was excited with light at a wavelength of 470–495 nm, and emission was collected at 515–575 nm.

3. 結果

3-1 DAT 基質の in vitro 輸送試験による kon 及び koff の推定

Methylphenidate (0.0781~2.50 µM) の非存在下または存在下で観察された DAT 基質の蛍

光強度プロファイルを Figure 3-2 に示す.



Figure 3-2. The time-course of observed and predicted fluorescent strength in the absence and presence of methylphenidate. The concentrations of methylphenidate were $0.0781-2.50 \mu$ M. Plots show observed data in the absence (diamonds) or presence (circles) of methylphenidate and lines show predicted data in the absence (solid) or presence (dashed) of methylphenidate.

DAT 基質の蛍光強度は時間とともに増加し, methylphenidate の濃度に依存して減少した. 各濃度における DAT 基質の蛍光強度の推移は式 (3-1) - (3-4) を用いて良好に記述でき, CV 値が 5%未満の k'on, C_{sub}, kon 及び k_{off}の推定値が得られた. また, methylphenidate の解離定 数 (Kd) を k_{off}/k_{on} から算出し, **Table 3-1** に示した.

Tested	C .	k'on	k (/uM/min)	lt m(/min)	V.4*(M)
concentration (μM)	Csub	(/min)	$K_{on}(/\mu WI/IIIII)$	Koff (/IIIII)	Κα ^ν (μινι)
Control	2360	0.0427			
Control	(0.32)	(0.99)	-	-	-
0.0781			0.926 (1.72)	0.0777 (1.94)	0.084
0.156			1.20 (1.73)	0.0818 (2.23)	0.079
0.313			1.24 (3.66)	0.129 (4.28)	0.104
0.625	-	-	2.31 (2.76)	0.250 (2.90)	0.108
1.25			1.14 (2.53)	0.146 (2.78)	0.128
2.50			0.810 (3.71)	0.122 (4.19)	0.151

Table 3-1. Estimated in vitro kinetic parameters (CV%) for fluorescent substrate and methylphenidate.

*Kd (µM): dissociation constant for methylphenidate or cocaine and calculated as koff/kon

この時の methylphenidate の DAT に対する Kd 値は, 報告値 (Ki 値: 84±33 nM) と同程度 であった. また, モデルの妥当性を確認するために, cocaine の k_{on} 及び k_{off} 値も評価した. Cocaine (0.313 μ M および 0.625 μ M) の非存在下または存在下で観察された cocaine の推定 パラメータを Table 3-2 に, DAT 基質の蛍光強度プロファイルを Figure 3-3 に示す. 構築したモ デルは cocaine 評価時の蛍光強度の推移も適切に記述可能であり, 推定された k_{on} 及び k_{off} の CV 値も小さかった. Cocaine の Kd 値も同様に報告値 (Ki 値: 120 nM) と同程度であった. こ れらの結果から, 構築した数理モデルは妥当であり, DAT 阻害薬の k_{on} および k_{off} 値を簡便に 推定できることが明らかとなった.

Table 3-2. Estimated in vitro kinetic parameters (CV%) for fluorescent substrate and cocaine.

Tested	C .	k'on	kon	k cc(/min)	Kd*(uM)
concentration (μM)	Csub	(/min)	$(/\mu M/min)$	\mathbf{K}_{Off} (/ IIIIII)	Κά (μινι)
Control	2360 (0.32)	0.0427 (0.99)	-	-	-
0.313			0.492 (1.34)	0.123 (1.64)	0.250
0.625	-	-	0.512 (1.55)	0.134 (1.67)	0.261

*Kd (μ M): dissociation constant for methylphenidate or cocaine and calculated as k_{off}/k_{on} .



Figure 3-3. The time-course of observed and predicted fluorescent strength in the absence and presence of cocaine. The concentrations of cocaine were 0.313 and 0.625 μ M. Plots show observed data in the absence (diamonds) or presence (circles) of cocaine and lines show predicted data in the absence (solid) or presence (dashed) of cocaine.

4. 考察

中枢神経系用薬の薬力学マーカーとして評価される受容体およびトランスポーターに対する km及び koff は薬効を考察する上で有用なパラメータであることから、これらを簡便に算出可能な 解析方法を開発することは創薬において非常に有用な情報を提供することにつながると考えら れる. 今回使用した神経伝達物質トランスポーター取り込み評価キットである Neurotransmitter Transporter Uptake Assay Kit は,一般的に定常状態における DAT に対する薬剤の IC50を算出 するために使用されている⁴²⁾.この評価キットでは, DAT を介した基質の細胞取り込みに由来 する蛍光強度の経時的な変化を評価することが可能であることから, DAT による基質の時間依 存的取り込み推移に対して数理モデルを当てはめることにより、DAT に対する阻害薬の速度パ ラメータを推定できると考えた. 一般的に受容体に対する速度パラメータは Danhof ら 43) 及び de Witteら44)の方法論を用いて推定可能である. つまり, 受容体に対して化合物及びトレーサ ーまたは内因性物質は競合的に結合し、それらの総量や濃度は実験系において一定であるこ とを仮定したモデルを使用すれば算出可能である.一方,トランスポーターの場合,基質は細 胞内に一方向にのみ輸送される場合が多く,実験緩衝液中の基質の量や濃度は時間依存的 に変化することから, 受容体とは異なるアプローチの検討が必要であり, DAT 阻害のメカニズム に基づき、DATに対するkonとkoffを推定可能な、基質の時間依存的変化を含む新規の数理モ デルを確立した.

DAT を含め、トランスポーターの輸送は一般的に Michaelis-Menten 式で説明されるが、今回

は一次速度モデルを選択した. その理由は, Michaelis-Menten 方程式のみかけの速度 (V_{app}) は, DAT 基質の濃度が Michaelis 定数 (Km) よりはるかに低いと仮定した場合, V_{max}/K_m×(濃 度) として近似できるためである. 本評価系で使用している DAT 基質の実際の濃度は公開され ていないが, 推定された k_{on} 及び k_{off} 値から算出した Kd 値 (methylphenidate: 104 nM, cocaine: 261 nM) は, 論文報告された Ki 値 (methylphenidate: 84-109 nM⁴¹⁾, cocaine: 120-210 nM⁴⁵⁾) と同程度であり, この仮説の妥当性が示された.

蛍光の最大強度は,各評価時の試料調製及び試験環境の違いに影響を受ける可能性が考 えられた.そこで,モデルにおいては,定常状態における蛍光の最大強度を説明する C_{sub}を可 変パラメータとして扱い,試験間のばらつきを補正できるように設定した.また,本評価系ではヒ ト組換え DAT が使用されているが,ラットとヒトのドパミントランスポーターの相同性が92%と高い こと,ヒトとラットのドパミントランスポーターにおける各種ドパミン取り込み阻害薬の Ki 値の順位 が高い相関を示すこと及び両種の methylphenidate の Ki 値も同程度であることから⁴⁶⁾, ラットの 受容体占有率を計算する際にも使用可能と考えられた.

以上,実験系を模して構築した数理モデルを用いることで,methylphenidate が DAT に対す る占有率を速度論的に検討可能となった.中枢神経系用薬の薬力学マーカーとして受容体占 有率はこれまで評価されてきたが,トランスポーターに対しても同様に,kon及び koff が簡便に推 定できること,実験系のスループットも良好であることから,本評価を実施することで,様々な薬 剤を評価可能となり,薬物動態データ及び本評価から経時的な DAT 阻害作用を予測可能と考 えられた.

第2節

ラットへ methylphenidate を投与した時の DAT 占有率に基づく PK-PD モデルを用いた ドパミン遊離量の検討

1. 緒言

ラットへ methylphenidate を投与した時の血漿中濃度, 脳内フリー濃度の代替と考えられている 脳脊髄液 (Central spinal fluid: CSF) 中濃度⁴⁷⁾ 及び本章第1節で得られた kon 及び koffを用 いて中枢神経系用薬の薬力学マーカーの1 つである経時的な DAT 占有率を計算し, DAT 阻 害作用によって生じる内因性物質のドパミン遊離量を定量的に関係付けることが可能か PK-PD モデルを用いて検討した.

2. 実験方法

2-1 Methylphenidate の薬物動態学的検討

2-1-1 実験動物

実験4日前に、6週齢雄性Wistar系ラット (Crlj:WI;日本チャールズリバー社, Yokohama, Japan) にイソフルラン麻酔下, 頸静脈にカニューレを施した. カニューレの一端は皮下を通して頚部外側から体外へ導出した. 実験は動物を術後十分に回復させた後, 無麻酔非拘束下及び摂食状態で行った.

2-1-2 投与液の調製

Methylphenidate の投与液は, 生理食塩液に溶解し調製した.

2-1-3 Methylphenidate の投与試験及び血漿中, 脳中及び CSF 中濃度測定

まず, methylphenidate の血漿中濃度を評価するため, methylphenidate (1-6 mg/kg) を単 独で単回腹腔内投与した. 投与後, 2, 5, 15, 30, 60, 120 及び 240 分に頸静脈よりヘパリン 及び EDTA-2K を含む注射筒を用いて血液を採取し, 氷冷チューブに移した. 続いて, methylphenidate の脳及び CSF への移行性を評価するため, methylphenidate (1-6 mg/kg) を 単回腹腔内投与し, 投与 30 分後にイソフルラン麻酔下で下大静脈よりヘパリン及び EDTA-2K を含む注射筒を用いて全血液を採取した後, 氷冷チューブに移した. その後, 23-G の針を接続したポリエチレンチューブを用いて CSF を採取し, 等量のアセトニトリルで希 釈したのち氷冷チューブに移した. さらに, 脳を採取し, 脳と水の重量比が 1:3 になるように水 を添加し,ホモジナイザーを用いてホモジネートした.血液検体は1600g,4℃で10分間遠心 分離し,血漿を得た.得られた検体から,HPLC-MS/MS 法を用いて各薬物濃度を測定した. 測定方法の概要は以下の通りである.

血漿検体をアセトニトリルで除タンパクし, 上清 0.2 μL を HPLC に注入し, HPLC-MS/MS 法により測定した. 測定条件は以下の通りである.

System: API4000 (SCIEX, Foster City, CA, USA).

Column: L-column2 ODS (3 µm) (2.0×50mm, GL Sciences, Tokyo, Japan)

Mobile phase: 0.1% formic acid : acetonitrile (gradient)

Flow rate: 0.75 mL/min

Ionization: ESI

Column temperature: 40°C

Collision: 35.00 eV

Detection : 234.4 m/z > 84.2 m/z

2-2 Methylphenidate 投与後の側坐核における脳内ドパミン変化量の評価

2-2-1 実験動物

実験の2または3日前に、6週齢雄性 Wistar 系ラット (Crlj:WI;日本チャールズリバー社) にペントバルビタール及びブトルファノール麻酔下、透析ブローブ (EicomCorp, Kyoto, Japan) を側坐核の shell (Bregma より Anterior +1.8mm, Lateral +0.8mm, Ventral +6.2mm) へ挿入し、歯科石膏を用いて固定した. 術後鎮痛のため、ブプレノルフィン 0.02 mg/kg を単 回投与した.

2-2-2 脳内ドパミンの測定

実験当日, 透析プローブにリンゲル液を2 µL/min で灌流し, 5 時間安定化した. その後, 覚醒下で生理食塩水に溶解した methylphenidate 1, 3 及び 6 mg/kg を腹腔内投与した. 透 析検体は6分ごとに投与後240分まで採取し, 前処置をせず, 速やかに HPLC-ECD 法を用 いてドパミンを測定した. 測定方法の概要は以下の通りである.

System: HPLC-ECD SYSTEM HTEC-500 (EicomCorp., Kyoto, Japan)

Software: Powerchrom® (eDAQ Pty., Ltd. Nagoya, Japan)

Column: PP-ODS II (EicomCorp., Kyoto, Japan)

Mobile phase: 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 5.25) containing 500 mg/L sodium

1-decanesulfonate, 50 mg/L EDTA • 2Na and methanol (98/2, v/v) Flow rate: 0.5 mL/min

ドパミンは、ベースラインからの変化量として記録した.

2-3 データ解析

モデルに依存しない薬物動態パラメータはエクセル 2010 を用いて計算した. またモデルに 依存するパラメータは WinNonlin (version 6.2.1, Pharsight 社) を用いて推定した. C_{max}及び AUC の用量比例性は SAS (version 9.2, SAS 社) を用いて評価した.

2-4 PK-PD モデル構築

Figure 3-4 に本試験で使用した PK-PD モデルを示す.



Figure 3-4. The structure of the pharmacokinetic-pharmacodynamic model for dopamine levels in the brain after intraperitoneal administration of methylphenidate.

本モデルは、以下の4点を考慮して構築した.

- 1. Methylphenidate の血漿中濃度は 2 相性の消失を示したことから、 2-コンパートメントモデルを選択.
- 2. Methylphenidate の CSF 濃度は血漿中濃度と瞬時に平衡が成立する.
- 3. DAT 占有率は methylphenidate の CSF 濃度, kon 及び koff から算出可能.

4. ドパミンは生合成された後シナプスから遊離し, methylphenidate とは結合しない DAT を 介したシナプス内への再取り込み及びシナプス中からの消失で記述可能.

血漿及び CSF 中 methylphenidate 濃度は線形を仮定し、以下の式で記述した. $dA_{ip}/dt = -k_a \cdot A_{ip}$ (3-5) $dA_{central}/dt = k_a \cdot A_{ip} - k_e \cdot A_{central} - k_{12} \cdot A_{central} + k_{21} \cdot A_{peri}$ (3-6) $dA_{peri}/dt = k_{12} \cdot A_{central} - k_{21} \cdot A_{peri}$ (3-7) $C_{plasma} = A_{central}/(V_d/F) / MW \cdot 1000$ (3-8) $C_{CSF} = C_{plasma} \times Kp_CSF$ (3-9)

ここで, A_{ip}, A_{central} 及び A_{peri} は投与部位, 中心及び末梢コンパートメント中の methylphenidate の量 (mg/kg), F はバイオアベイラビリティ, V_d/F は F で補正した methylphenidate の中心コンパ ートメントの分布容積 (L/kg), k_a, k₁₂, k₂₁ 及び k_e は投与部位からの吸収, 末梢または中心コン パートメントへの分布及び中心コンパートメントからの消失に関する 1 次速度定数 (/min), MW は methylphenidate の分子量 (233 g/mol), C_{plasma} は血漿中 methylphenidate 濃度 (µM) を示 す. Kp_CSF は血漿中濃度に対する CSF 濃度比であり, C_{CSF} は CSF 中 methylphenidate 濃度 である.

脳内ドパミン変化率を解析するため, DAT 占有率を式 (3-10) で記述し, シナプス間隙にお けるドパミン変化率を式 (3-11) 及び (3-12) で記述した.

 $dDAT_{RO}/dt = k_{on} \times C_{CSF} \times (1 - DAT_{RO}) - k_{off} \times DAT_{RO}$ (3-10) $dDA_{pre}/dt = k_{syn} - k_{release} \times DA_{pre} + k_{reuptake} \times DA_{post} \times (1 - DAT_{RO})^{\gamma} - k_{deg} \times DA_{pre}$ (3-11) $dDA_{pre} \times DA_{pre} \times DA_{pre} \times DA_{pre} \times DA_{pre} \times (1 - DAT_{ro})^{\gamma}$ (2-12)

 $dDA_{post}/dt = k_{release} \times DA_{pre} - k_{reuptake} \times DA_{post} \times (1 - DAT_{RO})^{\gamma}$ (3-12)

ここで、DAT_{RO}は methylphenidate による脳内 DAT 占有率, kon 及び koff は methylphenidate の DAT に対する結合及び解離速度定数, DApre 及び DApost はプレシナプス及びシナプス間隙に おけるドパミン変化率, ksyn はドパミンの生合成を表すゼロ次速度定数, krelease, kreuptake 及び kdeg はそれぞれプレシナプスからシナプス間隙の遊離, シナプス間隙からプレシナプスへの再取り 込み及びシナプス間隙からのドパミンの分解を示す1次速度定数, γ はべき指数示す. kon 及び koff の値は評価した全ての methylphenidate の濃度で同程度であったことから, PK-PD モデリン グには第1節において 0.313 μM で評価した時の値 (kon: 1.24/μM/min 及び koff: 0.129/min) を 使用した.

3. 結果

1,3 及び 6 mg/kg の methylphenidate 腹腔内投与後の血漿中 methylphenidate 濃度プロファ イルを Figure 3-5 に, methylphenidate の薬物動態パラメータの算出値を Table 3-3 に示す.



Figure 3-5. The time-course profiles of observed and predicted concentrations of methylphenidate in plasma after intraperitoneal administration in wistar rats for pharmacokinetic study groups. Each symbol represents the observed mean \pm SD (n = 3-5) at 1 (open), 3 (gray), and 6 mg/kg (black), and each line represents the predicted value at 1 (solid), 3 (gray), and 6 mg/kg (dashed). [a]: normal scale and [b]: semilog scale.

Table 3-3. Pharmacokinetic parameters of methylphenidate in plasma after single intraperitoneal administration of methylphenidate to rats

Dose (mg/kg)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{inf} (ng·hr/mL)	T _{max} (min)	Kp_brain	Kp_CSF
1	139 ± 42.5	39.0 ± 7.96	2.0 ± 0.0	10.6 ± 0.85	1.31 ± 0.13
3	435 ± 84.2	166 ± 0.727	2.0 ± 0.0	11.2 ± 1.23	1.20 ± 0.04
6	1030 ± 143	372 ± 53.5	2.6 ± 1.3	11.2 ± 1.07	1.66 ± 0.19
		2 5)			

Data represents mean \pm SD (n = 3-5)

Methylphenidate は速やかに吸収され,血漿からの時間とともに二相性の消失を示した.用量 比例性を検討したところ, C_{max} の回帰の傾き及び95%信頼区間は1.13及び0.95~1.30, AUC_{inf} の傾きは 1.25 及び 1.15~1.36 となり, C_{max} はほぼ用量比例的に増加したが, AUC_{inf} は用量比 以上に増加した.薬物動態プロファイルは, AUC_{inf} が用量比例性よりも増加したものの,一次吸 収を伴う線形 2 コンパートメントモデルを選択することで血漿中 methylphenidate 濃度を適切に 記述可能であった. 1, 3 及び 6 mg/kg の腹腔内投与では, 脳/血漿比 (Kp_brain) 及び CSF/ 血漿比 (Kp_CSF) はそれぞれ 10.6~11.2, 1.20~1.66 であり, 投与量にかかわらず 1.0 以上 で一定であった. これらの結果は, methylphenidate の脳内分布が高く, 脳内曝露は 6 mg/kg ま で投与量に比例することを示した. 1, 3 及び 6 mg/kg の methylphenidate を腹腔内投与したとき の NAc におけるドパミンプロファイルを Figure 3-6 に, 各薬力学パラメータを Table 3-4 に示し た.低用量では個体間変動が大きかった.ドパミンの最高濃度到達時間 (T_{max_d}) 値 (16.5~ 25.5 分) は, 血漿中の methylphenidate 濃度 (2.0~2.6 分) と比較して遅かった. さらに,ドパミ ンの最高濃度 (L_{max_d}) およびドパミンの最終採血時点までの効果-時間曲線下面積 (dAUE_{all}) は用量依存的に増加した.



Figure 3-6. The time-course profiles of observed and predicted dopamine levels at extracellular space around nucleus accumbens after single intraperitoneal administration of methylphenidate to Wistar rats for pharmacodynamics study groups. Each symbol represents the observed mean \pm SD (n = 4) and each line represents the predicted value at 1 [a], 3 [b], and 6 mg/kg [c].

	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••		
Dose	L_{max_d}	dAUE _{all}	T_{max_d}
(mg/kg)	(% of baseline)	(% of baseline min)	(min)
1	260 ± 132	7633 ± 8385	25.5 ± 22.7
3	346 ± 110	9418 ± 3216	19.5 ± 13.3
6	455 ± 72.5	20324 ± 4414	16.5 ± 7.55

Table 3-4. Pharmacodynamic parameters of methylphenidate in microdialysate after single intraperitoneal administration of methylphenidate to rats.

Data represents mean \pm SD (n = 4).

 $dAUE_{all}$, change in the area under the effect-time curve for the dopamine level from time zero to the last time; $L_{max d}$, maximum dopamine level; $T_{max d}$, time to reach the maximum dopamine level.

各パラメータの推定値を Table 3-5 に示す. Ka は 7.77/min と大きく, PK パラメータから計算 されたメチルフェニデートの T_{max} はおよそ 0.6 分であった.

Table 3-5. Parameters of methylphenidate estimated by mechanism-based pharmacokinetic and pharmacodynamic model.

Parameter	Definition	Estimate	CV (%)
k _a (/min)	Absorption rate constant	7.77	8.18
k ₁₂ (/min)	First-order rate constant from plasma to peripheral compartment	0.0141	38.5
k ₂₁ (/min)	First-order rate constant from peripheral to plasma compartment	0.0330	27.2
k _e (/min)	Elimination rate constant from central compartment	0.0551	7.34
V _d /F (L/kg)	Distribution volume of methylphenidate in the central compartment	5.59	8.03
Kp_CSF	CSF-to-plasma concentration ratio	1.25	Observed
k _{deg} (/min)	Degradation rate constant of dopamine in synapse	0.0282	121
k _{release} (/min)	First-order rate constant for dopamine release <i>via</i> DAT	0.0629	49.8
kreuptake (/min)	First-order rate constant for dopamine reuptake from synapse	0.533	20.3
γ	Exponent coefficient	0.578	8.18

CV = coefficient of variation.

CSF 中の methylphenidate 濃度は血漿中濃度および Kp_CSF (式 (3-9)) で算出したが, Kp_CSF 値は個体間および用量間でのばらつきが小さいと判断できたため,9 匹のラットからの 平均値を用いた.1,3 及び 6 mg/kg の methylphenidate の腹腔内投与後の算出された DAT 占 有率の経時変化を Figure 3-7 に示した.



Figure 3-7. Calculated occupancy for dopamine transporter after intraperitoneal administration of methylphenidate at 1 (solid line), 3 (gray line), and 6 mg/kg (dashed line).

Methylphenidate の DAT 占有率は用量依存性を示し、DAT 占有率のプロファイルに対する T_{max} は 2.0~4.0 分, 血漿中濃度は 2.0~2.6 分であったことから, 血漿中濃度プロファイルと methylphenidate の DAT 占有率との間に時間遅延はほとんどないことが示唆された. そこで, 脳 内のドパミン挙動と methylphenidate 投与によるドパミン再取り込み阻害を考慮することで、メカ ニズムに基づく PK-PD モデル (Figure 3-4) を構築し, 脳内の細胞外ドパミン濃度の変化を適 切に記述可能であった. これらの結果は、メカニズムに基づく PK-PD モデルが、脳における細 胞外ドパミンプロファイルを記述できることを示した.

4. 考察

本節では、第1節で構築した数理モデルを用いて算出した methylphenidate の kon 及び koff 値とラットにおける methylphenidate の薬物動態プロファイルから中枢薬の薬力学マーカーの1 つである DAT 占有率の経時推移を予測し、予測された DAT 占有率と脳内ドパミン遊離量の変 化を定量的に解析した.

ラットに methylphenidate を腹腔内投与した後, 血漿中の methylphenidate 濃度はほぼ用量に 比例して増加したことから, 線形 2-コンパートメントモデルを用いて血漿中濃度を解析した. 吸 収速度定数が高値を示したが,投与経路が腹腔内投与であること及び methylphenidate が生理 食塩水に完全に溶解していたことが原因と考えられた.得られた PK パラメータから計算された メチルフェニデートの T_{max} は 0.6 分と推定されたが,この値は最初の採血時点 (2分) と比べて 早かったものの,投与経路に吸収過程を有すること,各パラメータの CV 値が小さかったこと及 び予測値が実測値を適切に記述できたことから,吸収コンパートメントの挿入は適切と考えられ た.また,血漿中濃度について,予測値と実測値との間には若干の乖離が認められたが,その ばらつきはほぼ 2 倍以内であり,許容可能であった.また,methylphenidate の Kp_CSF 及び Kp Brain はそれぞれ 1.20~1.66 及び 10.6~11.2 と高く,中枢移行性は良好であった.

Aoyama らの報告⁴⁹⁾ では、細胞外液に基づく methylphenidate の推定 Ki 値は in vitro 値と 同程度であった. さらに、今回評価した CSF 中 methylphenidate 濃度は報告された ECF 中の濃 度と同程度であり、一般に CSF 中の薬物濃度は ECF 中の非結合型濃度を反映すると考えられ ている⁴⁷⁾. 従って、DAT 占有率は CSF 濃度に基づいて計算した. さらに、Patrick らは、 methylphenidate 静脈内投与後の脳への分布に時間的な遅れはほとんどないことを報告してい る⁵⁰⁾. したがって、CSF 中濃度は、中心コンパートメントに CSF コンパートメントを直接的に結合 したモデルを構築することとした. Methylphenidate の血漿中濃度、Kp_CSF, kon 及び koff から算 出した DAT 占有率のプロファイルは血漿中濃度推移と比べて大きな時間的な遅れはなく、類 似していた (Figure 3-7). 一方、ドパミンプロファイルの T_{max_d} は DAT 占有率が最大となるよりも 約 4~13 倍長く、DAT 占有率とドパミンプロファイルの間に反時計回りのヒステリシスが認められ た.

次に、ドパミン生合成、シナプスからの遊離、DAT を介した再取り込みおよび代謝の過程を 含む薬力学モデルを確立し、脳におけるドパミンの挙動を解析した. NAc core 領域における DAT を介したドパミンの取り込みに対する Michaelis-Menten 式の V_{max} 及び K_m値は、それぞれ 2-3 μ M/s 及び 0.16-0.20 μ M と報告されており⁵⁰)、脳中細胞外スペースにおけるドパミン濃度は 海馬で 219 ± 36 pM⁵¹)、内側前頭前野で 1.8 ± 0.5 nM と報告されている⁵²). 脳中細胞外スペー スのドパミン濃度は K_m と比べて低かったことから、ドパミン再取り込みに対する見かけの取り込 み速度 (V_{app}) は V_{max}/K_m× (ドパミン変化率) として近似可能であった. したがって、in vitro 輸 送試験のデータから methylphenidate の kon と koff を計算した場合と同様に、ドパミンの再取り込 み率を一次速度式により記述した. 推定された k_{reuptake}の値は k_{release}と比べて約 10 倍高く、DAT によるドパミン再取り込みに対して高い活性を示した. また、k_{reuptake}の推定値は methylphenidate の kon よりもはるかに低く、ドパミンプロファイルの反時計方向のヒステリシスの原因の一つにドパ ミンの緩徐な遊離が考えられた. また、k_{deg} の CV (%) は大きく、特に低用量群ではドパミン濃 度に大きなばらつきがあったためと考えられた. さらに,本検討によって DAT 占有率と DAT 再取り込み阻害の間の関係を明らかにした. DAT 占有率とドパミン再取り込みの相互作用の程度を表すべき指数は 0.578 と算出され (Table 3-5), DAT 占有率に対し脳内の細胞外ドパミン濃度は非線形的に増加する可能性が示された (Figure 3-8).



Figure 3-8. The relationship between dopamine transporter occupancy and dopamine reuptake calculated using the equation: dopamine reuptake = $(1 - DAT_{RO})^{\gamma}$. Dashed line shows the correlation in the case of $\gamma = 1$ and solid line shows the correlation in the case of $\gamma = 0.578$ (our result).

Dougherty らは、ADHD 患者の DAT の密度が健康成人と比較して 70%増加したと報告した ⁵³⁾. したがって、ADHD の病態モデル動物として知られる SHR⁵⁴⁾ などの疾患モデル動物を使用し、病態の影響も考慮する必要があると考えられた. また、今回構築した PK-PD モデルはドパミンプロファイルを適切に予測できる一方で治療結果との関連性はまだ明らかではない. ドパミンプロファイルと治療結果の関係を明らかにするためには追加の研究とメカニズムモデルの構築が必要になる可能性がある. 一方、Zuideveld は、動物データから得られた一次速度定数をアロメトリーの手法を用いてヒトの薬力学的関係を予測できることを報告している ³⁹⁾. 今回構築したモデルは一次速度定数を用いてドパミンプロファイルを解析していることから、Zuideveld と同様に、methylphenidate をヒトに投与したときのドパミンプロファイルを予測できる可能性が考えられる.

以上より, in vitro 試験及び数理モデルに基づく kon 及び koffを用いて推定した DAT 占有率 を組み込んだ PK-PD モデルから, ラットへの methylphenidate 投与後に観察されたドパミンプロ

ファイルを適切に予測することに成功した.本研究がターゲット占有率に基づくドパミン動態に 関連した最初の報告であるが,算出したパラメータの妥当性は,methylphenidate と同様の薬理 学的メカニズムを有する他の化合物を用いた追加評価が必要と考えられる.

中枢神経系用薬の開発において、標的受容体占有率と内因性物質の反応を解析メカニズム に基づく PK-PD モデルは、考えられるメカニズムの適切性の証明と薬理学的考察の確立に寄 与すると考えられている.ただし、ヒトにおける標的受容体占有と内因性物質の反応の関係に関 する情報が限られており、ヒトにおける脳内の内因性物質の評価は困難であることから、非臨床 動物から得られた結果を用いて PK-PD モデルを構築することは有効性を予測する上で有用な ツールとなりうる.本研究で使用した methylphenidate は脳内 DAT の阻害を介してドパミン濃度 を上昇させることにより ADHD の治療に用いられていることから、本剤は機序に基づく PK-PD モデルの開発に適切であると考えた.本試験では、in vitro 輸送アッセイシステムに由来する methylphenidate の konおよび koffを用いて、脳内ドパミン変化率を記述する機構に基づく PK-PD モデルを開発することを目的とし、ラットへの methylphenidate 投与後の脳におけるドパミンプロ ファイルをメカニズムに基づいて適切にモデリングすることに成功した.これらのモデルは、DAT の薬理作用を理解するために有用と考えられた.今後の研究では、ADHD などのドパミン関連 疾患の適切な治療効果を予測するために、さらなる詳細な検討を行い PK-PD モデルを高度に 発展・展開させる必要があると考えられた.

5. 小括

マイクロダイアリシスを用いた薬効評価は有効性の評価に関する確度は非常に高い一方で, 動物に対する侵襲性が高く,さらに評価に時間が掛かる点が課題である. 今回構築したモデル を用いれば, in vitro 試験及び PK データから有望化合物をスクリーニング可能であることから, 創薬の効率化に有用であると考えられる. また, 各種方法によって予測したヒト PK プロファイル を用いることにより, ヒトにおける薬効の予測も可能になると考えられる.

結語

本研究では、医薬品の研究開発における開発化合物を選抜する過程において、非臨床試験で評価した薬力学バイオマーカーや代替マーカーの変化を定量的に考慮した PK-PD モデ ル構築に関する方法を検討するとともに、薬効予測性について評価を行い、以下の知見を得た.

- 1. Losartan 及び hydrochlorothiazide を対象として, 両薬物単独及び併用投与後の血圧低 下効果に対し, 薬力学マーカーとして選択した血漿レニン活性を指標とした PK-PD モデ ルを構築することで, 薬力学的相互作用を投与量と関連付けて定量的に説明できること を示した.
- 2. Apo-B mRNA を標的としたアンチセンス核酸を対象として,血漿中濃度,標的組織中濃度,薬力学マーカーとしての標的 mRNA の変化及び代替マーカーとしての血漿中総コレステロールの変化を組み込んだ PK-PD モデルを構築することにより,従来の血漿中濃度からは考察できない持続的な有効性が説明できることを示した.
- 3. ドパミントランスポーターに対して阻害作用のある methylphenidate 及び cocaine を用いて in vitro 試験における結合及び解離速度定数を算出可能な数理モデルを構築するととも に, methylphenidate 投与後の脳内ドパミン変化を記述できる PK-PD モデルを構築した. 本モデルを活用することで in vitro 試験結果及び PK プロファイルから薬効を予測できる ため, 化合物選抜の効率化に応用できる可能性を示した.

第1章では、臨床で評価可能かつ保険適用のあるバイオマーカーの推移を組み込むことで 相乗的な薬力学的相互作用を解析する手法を構築した. Losartan と hydrochlorothiazide の合 剤はすでに上市されているが、新たに薬力学的相互作用を期待した併用療法等を検討する場 合、本研究と同様に非臨床動物を用いて相乗効果を説明可能な薬力学マーカーと有効性の 関係を PK-PD モデルを用いて定量的に解析し、その妥当性を臨床試験で検証することによっ て、最適な用法・用量設定に有用な情報を提供が可能になると考えられる. また、実臨床では TDM の対象薬剤でない限り患者の薬物濃度を評価されることはないが、保険適用されたバイ オマーカーは評価可能である。そのようなバイオマーカーを優先的に選択することで、上市後も 患者にあわせた有効性の評価や用量設定が可能であると考えられる. 第2章では、核酸医薬品を投薬した時の有効性を記述するために、マウスの肝臓中濃度や mRNAの変化を考慮したモデルを構築した.核酸医薬品の開発は現在も盛んに実施されてお り、試験によってはヒトでも肝生検を実施し、薬物濃度の測定や mRNAの評価をされている例 が報告されている.この時、多くの被験者に肝生検を実施することが困難であるが、非臨床試験 でモデルを用いた検討を実施することで、解析のための有用な情報を提供できる可能性が考え られる.

上記 2 つの検討では, in vivo 試験からの情報に基づく解析となるため,開発候補化合物を 選択した上での検討となるが,構築した PK-PD モデルに in vitro 評価を組み込むことができれ ば薬物動態プロファイルと併せて薬効の予測が可能となり, in vivo 試験の目標値設定に役立 つと考え,第 3 章の検討を実施した.対象となるバイオマーカーが神経伝達物質であり, ヒトで は評価が困難であることから, モデルを直接ヒトへ適応することは困難であるものの非臨床試験 に基づく検討を考慮しておくことは有用であると考えられた.

以上,著者はバイオマーカーの変動を組み込んだ PK-PD モデルを構築する方法を検討す ることにより臨床で認められている事象を非臨床試験の PK-PD モデリングより説明できることを 示した.また,モデリングの手法を応用し, in vitro 試験結果を組み込んだモデルを検討したこと により,様々な薬物をより早期に薬効を想定したスクリーニングが可能であることも示した.核酸 化合物では in vitro 試験結果を用いたモデリングの検討を実施していないが,PK-PD 解析に適 応できることを考慮すると,低分子化合物と同様にスクリーニングへの活用も可能になると考えら れる.かねてより実験動物を用いた PK プロファイルからヒト PK プロファイルを予測する方法論 が検討されていることから,ヒトPK プロファイルと in vitro 試験結果を統合することでヒトにおける 薬効を予測できる可能性も考えられる.本研究成果は,創薬のステップにおいて目的とするモ デルを構築することができれば医薬品の研究,開発,更には臨床使用においても有用な情報 を提供できる可能性を示すものであり,今後の創薬研究,特に医薬品の選抜,有効性指標の選 択及び予測に基づく用法・用量の設定に有益な情報を与えるものと考えられる.

論文目録

- The pharmacokinetic-pharmacodynamic assessment of the hypotensive effect after coadministration of losartan and hydrochlorothiazide in spontaneously hypertensive rats <u>Ryosuke Shimizu</u>, Makoto Miyazaki, Kazunori Iwanaga, and Masawo Kakemi Drug Metabolism and Pharmacokinetics 27(2), 207-215 (2012)
- Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling for reduction of hepatic apolipoprotein B mRNA and plasma total cholesterol after administration of antisense oligonucleotide in mice <u>Ryosuke Shimizu</u>, Mikiko Kitade, Takashi Kobayashi, Shin-Ichiro Hori, and Ayahisa Watanabe Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics 42(1), 67-77 (2015)
- Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of Brain Dopamine Levels based on Dopamine Transporter Occupancy after Administration of Methylphenidate in Rats <u>Ryosuke Shimizu</u>, Naotaka Horiguchi, Koji Yano, Masashi Sakuramoto, Naoki Kanegawa, Shunji Shinohara, and Shuichi Ohnishi Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 369(1), 78-87 (2019)

参考文献

- Steven MP, Daniel SM, Christopher TD, Charles CP, Bernard HM, Stacy RL, Aaron LS. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. Nat Rev Drug Discov, 9, 203-14 (2010).
- 2) Schuhmacher A, Gassmann O, Hinder M. Changing R&D models in research-based pharmaceutical companies. J Transl Med, 14, 105 (2016).
- Goto A, Abe S, Koshiba S, Yamaguchi K, Sato N, Kurahashi Y. Current status and future perspective on preclinical pharmacokinetic and pharmacodynamic (PK/PD) analysis: Survey in Japan pharmaceutical manufacturers association (JPMA). Drug Metab Pharmacokinet, 34, 148-154 (2019).
- European Medicines Agency. Committee for Human Medicinal Products. Concept paper on qualification and reporting of physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modelling and analyses. (2014). <u>https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/conceptpaper-qualification-reporting-physiologically-based-pharmacokinetic-pbpk-modellinganalyses en.pdf
 </u>
- 5) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Exposure-Response Relationships — Study Design, Data Analysis, and Regulatory Applications. <u>https://www.fda.gov/regulatoryinformation/search-fda-guidance-documents/exposure-response-relationships-study-designdata-analysis-and-regulatory-applications</u>
- 6) 厚生労働省. 母集団薬物動態/薬力学解析ガイドライン. 薬生薬審発 0515 第1号 (令和元年5月15日)
- 7) 永井尚美. 医薬品開発における PK-PD 解析と Modeling and Simulation -審査の立場から-Jpn J Clin Pharmacol Ther, 41, 217-222 (2010).
- Iris Rajman. PK/PD modelling and simulations: utility in drug development. Drug Discov Today. 13, 341-6 (2008).
- 9) EFPIA MID3 Workgroup; Marshall SF, Burghaus R, Cosson V, Cheung SYA, Chenel M, DellaPasqua O, Frey N, Hamrén B, Harnisch L, Ivanow F, Kerbusch T, Lippert J, Milligan PA, Rohou S, Staab A, Steimer JL, Tornøe C, Visser SAG. Good Practices in Model-Informed Drug Discovery and Development: Practice, Application, and Documentation. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol, 5, 93-122 (2016).
- 10) Bhavnani SM, Trang M, Griffith DC, Lomovskaya O, Hammel JP, Loutit JS, Cammarata SK, Dudley MN, Ambrose PG, Rubino CM. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Target Attainment Analyses as Support for Meropenem-Vaborbactam Dosing Regimens and

Susceptibility Breakpoints. Antimicrob Agents Chemother, 66, e0213021 (2022).

- 11) Kawaguchi N, Katsube T, Echols R, Wajima T. Population Pharmacokinetic and Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Analyses of Cefiderocol, a Parenteral Siderophore Cephalosporin, in Patients with Pneumonia, Bloodstream Infection/Sepsis, or Complicated Urinary Tract Infection. Antimicrob Agents Chemother, 17, 65, e01437-20 (2021).
- 12) Katsube T, Shimizu R, Fukuhara T, Kano T, Wajima T. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modelling and Simulation of Lusutrombopag, a Novel Thrombopoietin Receptor Agonist, for the Treatment of Thrombocytopenia in Patients with Chronic Liver Disease Undergoing Invasive Procedures. Clin Pharmacokinet, 58, 1469-1482 (2019).
- 13) Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther, 69, 89-95 (2001).
- 14) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Qualification Process for Drug Development Tools Guidance for Industry and FDA Staff. <u>https://www.fda.gov/media/133511/download</u>
- 15) 水戸 誠二, 酒井 正樹, 鈴木 將之. 薬剤応答性モニタリングバイオマーカー:入発とその 課題. 日薬理誌 148, 302-304 (2016)
- 16) 日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン作成委員会. 高血圧治療ガイドライン 2019.
- 17) Villamil A, Chrysant SG, Calhoun D, Schober B, Hsu H, Matrisciano-Dimichino L, Zhang J., Renin inhibition with aliskiren provides additive antihypertensive efficacy when used in combination with hydrochlorothiazide. J Hypertens, 25, 217-26 (2007)
- Verdecchia P, Angeli F, Mazzotta G, Gentile G, Reboldi G., The renin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: role of aliskiren in risk reduction. Vasc Health Risk Manag, 4, 971-981, (2008).
- 19) Azizi M, Ménard J, Bissery A, Guyenne TT, Bura-Rivière A, Vaidyanathan S, Camisasca RP., Pharmacologic demonstration of the synergistic effects of a combination of the renin inhibitor aliskiren and the AT1 receptor antagonist valsartan on the angiotensin II-renin feedback interruption. J Am Soc Nephrol, 15, 3126-3133, (2004).
- 20) Kim GH, Na KY, Kim SY, Joo KW, Oh YK, Chae SW, Endou H, Han JS., Up-regulation of organic anion transporter 1 protein is induced by chronic furosemide or hydrochlorothiazide infusion in rat kidney. Nephrol Dial Transplant, 18, 1505-1511, (2003).
- 21) 高山 文夫, 斉藤 郁, 吉永 智美, 森田 美津子, 畑 俊輔, 江角 凱夫, 神 義容, 岡村 裕一, 新規アンジオテンシンII受容体拮抗薬ロサルタンの体内動態(第1報): ラットにおけ る単回投与時の吸収、分布、代謝、および排泄. 薬物動態, 10, 223-243, (1995).
- 22) Farthing D, Sica D, Fakhry I, Pedro A, Gehr TW., Simple high-performance liquid chromatographic method for determination of losartan and E-3174 metabolite in human plasma, urine and dialysate. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 704, 374-378, (1997).

- Beal SL, Sheiner LB, Boeckmann AJ. NONMEM users guide, 1989–2006. Ellicott City (MD): Icon Development Solutions.
- 24) Lu W, Endoh M, Katayama K, Kakemi M, Koizumi T. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of piretanide in rabbits. I. Effect of different hydrated conditions. J Pharmacobiodyn, 10, 356-363 (1987).
- 25) Beermann B, Groschinsky-Grind M, Rosén A. Absorption, metabolism, and excretion of hydrochlorothiazide. Clin Pharmacol Ther, 19, 531-7 (1976).
- 26) Walters PE, Gaspari TA, Widdop RE. Angiotensin-(1-7) Acts as a Vasodepressor Agent Via Angiotensin II Type 2 Receptors in Conscious Rats, Hypertension, 45, 960-966, (2005).
- 27) Package insert of Preminent[®] tablet, ver 9, Tokyo, MSD K.K., 2011.
- 28) Wienen W, Schierok HJ. Effects of telmisartan, hydrochlorothiazide and their combination on blood pressure and renal excretory parameters in spontaneously hypertensive rats. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2, 123-128 (2001).
- 29) Moon CH, Lee HJ, Jung YS, Lee SH, Baik EJ. Pharmacokinetics of losartan and its metabolite, EXP3174, after intravenous and oral administration of losartan to rats with streptozotocininduced diabetes mellitus. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 101, 147-158, (1998).
- 30) Yu RZ, Grundy JS, Geary RS. Clinical pharmacokinetics of second-generation antisense oligonucleotides. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 9, 169-82 (2013).
- 31) Grünweller A, Wyszko E, Bieber B, Jahnel R, Erdmann VA, Kurreck J. Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. Nucleic Acids Res, 31, 3185-93 (2003).
- Geary RS. Antisense oligonucleotide pharmacokinetics and metabolism. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 5, 381-91 (2009).
- 33) Yu RZ, Lemonidis KM, Graham MJ, Matson JE, Crooke RM, Tribble DL, Wedel MK, Levin AA, Geary RS. Cross-species comparison of in vivo PK/PD relationships for second-generation antisense oligonucleotides targeting apolipoprotein B-100. Biochem Pharmacol, 77, 910-9 (2009).
- 34) Turnpenny P, Rawal J, Schardt T, Lamoratta S, Mueller H, Weber M, Brady K. Quantitation of locked nucleic acid antisense oligonucleotides in mouse tissue using a liquid-liquid extraction LC-MS/MS analytical approach. Bioanalysis, 3, 1911-21 (2011).
- 35) Dandekar PK, Tessier PR, Williams P, Nightingale CH, Nicolau DP. Pharmacodynamic profile of daptomycin against Enterococcus species and methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a murine thigh infection model. J Antimicrob Chemother, 52, 405-11 (2003).
- Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. Pharm Res, 10, 1093–1095 (1993).
- 37) Briars L, Todd T. A Review of Pharmacological Management of Attention-

Deficit/Hyperactivity Disorder. J Pediatr Pharmacol Ther, 21, 192-206 (2016).

- 38) Yassen A, Kan J, Olofsen E, Suidgeest E, Dahan A, Danhof M. Mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the respiratory-depressant effect of buprenorphine and fentanyl in rats. J Pharmacol Exp Ther, 319, 682-92 (2006).
- 39) Zuideveld KP, Van der Graaf PH, Peletier LA, Danhof M. Allometric scaling of pharmacodynamic responses: application to 5-Ht_{1A} receptor mediated responses from rat to man. Pharm Res, 24, 2031-9 (2007).
- 40) Johnson M, Kozielska M, Reddy VP, Vermeulen A, Barton HA, Grimwood S, de Greef R, Groothuis GM, Danhof M, Proost JH. Translational Modeling in Schizophrenia: Predicting Human Dopamine D2 Receptor Occupancy. Pharm Res, 33, 1003-17 (2016).
- 41) Gatley SJ, Pan D, Chen R, Chaturvedi G, Ding YS. Affinities of methylphenidate derivatives for dopamine, norepinephrine and serotonin transporters. Life Sci, 58, 231-9 (1996).
- 42) Bernstein AI, Stout KA, Miller GW. A fluorescent-based assay for live cell, spatially resolved assessment of vesicular monoamine transporter 2-mediated neurotransmitter transport. J Neurosci Methods, 209, 357-66 (2012).
- 43) Danhof M and Ploeger B. Implementing receptor theory in PK-PD modeling. Population Approach Group in Europe Annual Meeting in 2008; 2008 June 19; Marseille, France (2008).
- 44) de Witte WEA, Versfelt JW, Kuzikov M, Rolland S, Georgi V, Gribbon P, Gul S, Huntjens D, van der Graaf PH, Danhof M, Fernández-Montalván A, Witt G, de Lange EC. In vitro and in silico analysis of the effects of D2 receptor antagonist target binding kinetics on the cellular response to fluctuating dopamine concentrations. Br J Pharmacol, 175, 4121–4136 (2018).
- 45) Slusher BS, Tiffany CW, Olkowski JL, Jackson PF. Use of identical assay conditions for cocaine analog binding and dopamine uptake to identify potential cocaine antagonists. Drug Alcohol Depend, 48, 43-50 (1997).
- 46) Giros B, el Mestikawy S, Godinot N, Zheng K, Han H, Yang-Feng T, and Caron MG. Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. Mol Pharmacol, 42, 383–390 (1992).
- 47) de Lange EC. Utility of CSF in translational neuroscience. J Pharmacokinet Pharmacodyn, 40, 315-26 (2013)
- 48) Patrick KS, Ellington KR, and Breese GR. Distribution of methylphenidate and phydroxymethylphenidate in rats. J Pharmacol Exp Ther, 231, 61–65 (1984).
- 49) Aoyama T, Yamamoto K, Kotaki H, Sawada Y, and Iga T. Pharmacodynamic modeling for change of locomotor activity by methylphenidate in rats. Pharm Res.14:1601-1606 (1997).
- 50) Budygin EA, Oleson EB, Mathews TA, Läck AK, Diaz MR, McCool BA, and Jones SR. Effects of chronic alcohol exposure on dopamine uptake in rat nucleus accumbens and caudate putamen. Psychopharmacology (Berl), 193, 495–501 (2007).

- 51) Van Schoors J, Viaene J, Van Wanseele Y, Smolders I, Dejaegher B, Vander Heyden Y, and Van Eeckhaut A. An improved microbore UHPLC method with electrochemical detection for the simultaneous determination of low monoamine levels in in vivo brain microdialysis samples. J Pharm Biomed Anal, 127, 136–146 (2016).
- 52) Faiman MD, Kaul S, Latif SA, Williams TD, and Lunte CE. S-(N,Ndiethylcarbamoyl)glutathione (carbamathione), a disulfiram metabolite and its effect on nucleus accumbens and prefrontal cortex dopamine, GABA, and glutamate: a microdialysis study. Neuropharmacology, 75, 95–105 (2013).
- 53) Dougherty DD, Bonab AA, Spencer TJ, Rauch SL, Madras BK, and Fischman AJ. Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. Lancet, 354, 2132– 2133 (1999).
- 54) Heal DJ, Smith SL, Kulkarni RS, and Rowley HL. New perspectives from microdialysis studies in freely-moving, spontaneously hypertensive rats on the pharmacology of drugs for the treatment of ADHD. Pharmacol Biochem Behav 90:184–197 (2008).

謝辞

本研究の終わりに鑑み,終始ご懇意なる御指導,御鞭撻を賜りました,大阪医科薬科大学 薬学部 宮崎 誠 教授に衷心より深甚なる謝意を表します.

同時に,本研究の遂行にあたり,懇切なる御指導と御協力を賜りました,大阪医科薬科大学 薬学部 掛見 正郎 教授,岩永 一範 教授に深く感謝申し上げます.

本研究の遂行にあたり,多大なる御協力と御助言を頂きました,塩野義製薬株式会社 北出 美樹子 氏,小林 隆史 氏,堀 真一郎 博士,渡邊 郁剛 博士,堀口 直剛 博士,矢野 耕 史 博士,櫻本 昌士 氏,金川 直樹 博士,篠原 俊次 博士,大西 秀一 博士に深く感謝の 意を表します.また,本研究の遂行にあたり,多大なる御協力と御助言を頂きました,塩野義製 薬株式会社小川 啓子 氏,弘中 貴成 氏,池原 達矢 博士,坂本 真吾 氏,根笹 賢一 博 士,有益な御助言を頂きました,塩野義製薬株式会社 山口 嘉隆 博士,長谷川 博司 博士 にそれぞれ謹んで感謝致します.

さらに,本研究に多大なるご協力を頂戴しました,大阪医科薬科大学 薬学部 薬剤学研究 室の皆様に心から感謝の意を表します.