

Pregnane X 受容体リガンドによる薬物間相互作用
の in silico 予測に関する研究

2015

吉田 秀哉

目次

総論の部

緒言.....	1
---------	---

第一章 再帰分割法を利用した Pregnane X 受容体活性化予測ディシジョンツリーの構築	2
---	---

第一節 テキストマイニングによる PXR-化合物間相互作用情報の抽出.....	3
---	---

- 1-a PXR 解析用動詞リストの作成
- 1-b PubMed 要旨からの PXR アゴニスト及び非アゴニストの抽出
- 1-c PXR 解析用テキストマイニングシステムの評価
- 1-d PubMed 要旨からの化合物-P-gp 間相互作用情報の抽出
- 1-e TP-Search データベースとの比較
- 1-f P-gp 基質と CYP3A4 基質間の共起の評価
- 1-g 考察

第二節 PXR 活性に関する構造活性相関解析	9
------------------------------	---

- 2-a 構造活性相関解析用のデータセットの構築
- 2-b 再帰分割法による PXR アゴニストの構造活性相関解析
- 2-c 考察

第二章 リファンピシン併用による CYP3A4 誘導を起因とする臨床薬物間相互作用予測モデルの構築	16
---	----

第一節 動的 CYP3A4 誘導モデルによる薬物間相互作用の予測.....	17
---------------------------------------	----

- 1-a 転写・翻訳過程を考慮した動的 CYP3A4 誘導モデルの構築
- 1-b CYP3A4 活性誘導に関する間接効果モデルの構築
- 1-c CYP3A4 活性誘導に関する静的モデルの構築
- 1-d リファンピシン PBPK モデルの構築
- 1-e CYP3A4 誘導の動的シミュレーション
- 1-f リファンピシン併用による薬物間相互作用の動的シミュレーション
- 1-g リファンピシン併用による AUC 変動の予測
- 1-h 考察

第二節 生体機能モデリング・シミュレーション環境を用いた薬物間相互作用モデルの実装	34
2-a SBML 及び PHML によるモデルの実装	
2-b PhysioDesigner による連成シミュレーション	
2-c 考察	
結論	39
謝辞	41
実験の部	42
第一章 実験の部	42
第二章 実験の部	44
引用文献	46

総論の部

緒言

薬物間相互作用 (drug-drug interactions: DDI)とは、多剤併用時に併用薬の影響により薬物の作用が変化することをいう。DDI の原因について様々な報告がなされているが、薬物代謝酵素やトランスポーターの活性変動が関係するケースがよく知られている¹。これまでに DDI が原因で市場から医薬品が消える例も報告されており、臨床薬物療法において配合禁忌として注意するだけに留まらず、医薬品開発においても市場後の併用を想定し、DDI の可能性を未然に回避することが必要とされている。米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA)²は、こうした視点から 2012 年に医薬品開発時における DDI 研究に関する改定版のドラフトガイダンスを発表した。この中では、特に数理モデルを用いた予測の重要性を説いており、製薬企業には生理学的速度論を理論基盤としたディシジョンツリーの活用を推奨している。また、同様のガイダンスが欧州医薬品庁 (European Medicines Agency: EMA)³ や医薬品医療機器総合機構 (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency: PMDA)⁴からも発表されている。

創薬研究は候補化合物の探索研究から始まり、ここでは大量の化合物が合成されハイスループットスクリーニングによる評価が行われる。しかしながら、化合物のライブラリ構築やスクリーニングに対するコストは大きく、化合物の構造情報からコンピューターを用いて有望な化合物を効率よく選択することが望まれている。さらに、探索研究段階において *in vitro* や動物を用いた試験により有望な化合物が見つかったとしてもその開発成功確率は低く、*in vitro-in vivo* 補外予測やアニマルスケールアップに対してさらなる予測性の向上が期待されている。

このような背景を受け、著者は、薬物代謝酵素の誘導に起因する DDI に着目し、各医薬品開発ステージでの異なるニーズに対する *in silico* モデリング手法の確立に取り組んだ。酵素誘導は遺伝子の転写翻訳を伴う細胞レベルでの現象であり、分子レベルで起きる酵素の阻害現象と比べると格段に予測が難しい。本研究では、主要な薬物代謝酵素の Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4)など多くの薬物動態関連タンパク質の発現調節に関わる代表的な核内受容体である Pregnane X 受容体 (PXR) に焦点を絞り、検討を行った。PXR は、リガンド結合によって活性化される核内受容体の一つであり、構造の異なる様々な薬物によって活性化を受ける⁵。その結果として薬物代謝酵素が誘導されると、基質薬物の薬物血中濃度が低下するという現象が起こる⁶⁻⁹。現在、こうした PXR を介する薬物間相互作用は臨床のみならず創薬研究でも大きな問題となっている。第一章では PXR アゴニストの構造活性相関解析、第二章では代表的な PXR リガンドのリファンピシンについて *in vitro-in vivo* 補外予測に関する研究を行った。以下、これらの研究成果について詳しく論述する。

第一章 再帰分割法を利用した Pregnane X 受容体活性化予測ディ ジジョンツリーの構築

Pregnane X 受容体 (PXR) は、CYP3A や P-糖タンパク質など薬物動態を規定する重要なタンパク質の発現誘導に関わる核内受容体である^{5,10}。リガンドが PXR に結合すると、PXR は活性化して retinoic X receptor (RXR) と二量体を形成し、二量体は核内へと移行して転写因子として機能する¹⁰。PXR は構造的に多様な薬物分子と結合することが既に知られており、PXR を介した酵素誘導等によって DDI が起こることも報告されている。

ヒト PXR の結晶構造解析も進んでおり、アポ体とリガンド結合状態におけるリガンド結合部位の構造が既に解かれている^{11,12}。PXR は電荷の少ない疎水的なリガンド結合部位を持っており、そのポケットの大きさは $1,150 \text{ \AA}^3$ と他の核内受容体と比べても非常に大きくなっている¹¹。さらに、その構造はフレキシブルで induced-fit が可能であり、これが多様な化合物と相互作用できる理由と結論されている。

PXR と化合物との相互作用を予測する試みはこれまでに多数報告されてきた¹³⁻²⁰。一般にリガンドドッキング¹³⁻¹⁶は有望な in silico 予測法として理解されているが、PXR のリガンド結合部位の大きさと柔軟性のために、リガンドと PXR の結合の定量的な予測には一部の限られた事例を除き成功に至っていない。それに代わる方法として、実験データに基づいて経験的な予測を行う構造活性相関法が注目されてきた^{15,17-22}。これまでもファーマコフォアモデル^{18,19,22}や機械学習^{15,20}などを利用して、レポーター遺伝子アッセイなどで得られた実験データからの予測モデルの開発が進められてきた。しかし、こうしたリガンドベースのアプローチではモデル構築の基礎となるデータの質と量が重要であり、PXR リガンドの構造活性相関解析においてもデータセットの改善にまだまだ余地が残っている。

著者の所属する研究室ではこれまでに文献から自動的に化合物-CYP3A4 間相互作用情報(基質、誘導、阻害)を抽出するテキストマイニングシステムを開発した²³。本システムは、文章中に記載される化合物と CYP3A4 の名前を辞書及び文脈ルールによって識別し、さらに構文解析で得られる文章中の動詞と併せた 3 つのキーワードの順序から化合物-CYP3A4 間相互作用情報を抽出する。単純なパターンマッチング法であるが、本システムは化合物名の識別では再現率が 87.4%、適合率が 92.3%を、相互作用の抽出では再現率が 85.2%、適合率が 92.0%を達成した。さらに本システムは異なる CYP 分子種に対しても適用され、構造活性相関研究の基礎データとして利用された²⁴。

こうした背景の下で、本章ではまず、化合物-PXR 間相互作用情報を PubMed データベースよりテキストマイニングシステムを用いて網羅的に収集することを試みた。これを実現するために、まず CYP の酵素反応に対して構築された動詞リストを、リガンド-受容体相互作用に対する解析に適するように動詞リストを再編した。さらに、これによって収集した PXR アゴニストと非アゴニストに関する情報と、PubChem BioAssay データベース及び論文報告データ^{15,20}を統合し、PXR リガンドに関する構造活性相関解析を行った。

第一節 テキストマイニングによる PXR-化合物間相互作用情報の抽出

一般に、レポーター遺伝子アッセイ等一次スクリーニングで得られるデータは多くのノイズを含んでいる。これに対して、データ解析を通じてクリーニングされ報告された論文情報は精度が高く信頼も厚いと言える。こうした観点から、筆者の所属研究室では論文要旨から化合物と CYP との相互作用情報を収集してきた^{23,24}。しかし本システムは自然言語処理を基盤とするために、解析対象に応じて適宜辞書やルールベースを改変する必要がある。そこで、本節では PXR 用にシステムを改変し構造活性相関解析のための基礎情報を収集するとともに、本テキストマイニングシステムのさらなる応用性を確認するために、薬物トランスポーターである P-glycoprotein (P-gp)への適用拡大も試みた。

1-a PXR 解析用動詞リストの作成

PXR はリガンド結合型の受容体であり、酵素である CYP とは化合物との相互作用の仕方は大きく異なる。そこで、PXR に関する情報を抽出するにあたり、特に結合や受容体の活性化等に関わる動詞を中心に選択し、リストの改変を行った (Table 1)。リストには化合物-PXR 間相互作用を示す動詞 (例えば、activate, induce, inhibit)だけではなく動名詞 (例えば、activation, induction, inhibition)も含めた。その他、相互作用を持つ化合物を示す名詞 (例えば、ligand)もリストに含めた。

Table 1. Verbs and verbal nouns used for classification of data sets into PXR agonists and antagonists

Category	Verbs and verbal nouns
Agonist	activate, activation, activator, agonist, enhance, increase, induce, inducer, stimulate, up-regulate, up-regulation, upregulate, upregulation
Antagonist	decrease, inhibit, inhibition, inhibitor, down-regulate, down-regulation, downregulate, downregulation, antagonist
Unclassifiable	affect, bind, interact, interaction, ligand, regulate, regulation

1-b PubMed 要旨からの PXR アゴニスト及び非アゴニストの抽出

PXR と化合物との相互作用に関する書誌情報を解析するにあたり、PubMed において PXR 名及びその同義語 (pregnene X receptor, SXR など)を検索キーワードとして用い、解析対象の論文要旨を選択した。得られた 1727 個の要旨の全文をダウンロードし、テキストマイニングを行った。本システムは、化合物-PXR 間相互作用情報の抽出を文ごとに行う仕組みとなっており、化合物名及び PXR 名の両方が含まれる文に対してさらに動詞リストとのパターンマッチングが行われ、動詞または動名詞が検知された場合には化合物/PXR/動詞がレコードとしてデータベースに保存される。Table 2 は、本システムによる PXR 活性に関する文献解析の一例を示したものである。今回の解析で得られたレコードのうち、3 つの相互作用カテゴリーに分類されたレコードの総数は 868 個であった。化合物の名前に重複があるものを削除してクリーニングした後、それらの構造情報を PubChem のデータベースより取得した。PubChem より構造が得られた化合物に対して二次元構造から ADMET Predictor 分子記述子を計算した。論文では異なった化合物名が使用されていることがあるため、二つの化合物間において全ての分子記述子と同じであった場合は同じ化合物であると判断した。最終的に 134 個の PXR アゴニストと 11 個の非アゴニスト、23 個のアンタゴニスト、1 個の非アンタゴニストを得ることができた。

1-c PXR 解析用テキストマイニングシステムの評価

テキストマイニングシステムの精度評価を目的として、無作為的に選んだ 100 個の要旨に対して化合物名識別及び相互作用情報抽出における再現率とその適合率を計算した。ここで再現率は、抽出された関連情報数の全関連情報数に対する割合であり、適合率は抽出された関連情報数の抽出された全情報数に対する割合である。評価の結果、化合物名識別において再現率、適合率が共に 94.6%、化合物-PXR 相互作用抽出において再現率、適合率が共に 89.7%であり、本システムは高い性能を持つことが示された。

Table 2. A typical example of the interaction extraction processes

Step	Process	Result
0		Zearalenone could induce the expression of the CYP3A4 gene transcription through activating PXR.
1	Part of speech and morphological processing	Zearalenone _{/NNP} could _{/MD} induce _{/VB(induce)} the _{/DT} expression _{/NN} of _{/IN} the _{/DT} CYP _{/NNP} 3 _{/CD} A _{/DT} 4 _{/CD} gene _{/NN} transcription _{/NN} through _{/IN} activating _{/VBG(activate)} PXR _{/NNP} .
2	Gazetter lookup and name identification	Zearalenone could induce the expression of the CYP3A4 gene transcription through activating PXR .
3	Noun group creation	<u>Zearalenone</u> could induce <u>the expression of the CYP3A4 gene transcription</u> through <u>activating PXR</u> .
4	Noun phrase creation	[Zearalenone] (could induce) [the expression of the CYP3A4 gene transcription] through (activating) [PXR].
5	Noun phrase group creation	Zearalenone {could induce} the expression of the CYP3A4 gene transcription through {activating} PXR .
6	Clause reconstruction	Zearalenone activating PXR.
7	Interaction extraction	Zearalenone activate PXR (agonist); rule: (Chem) (keyVerb, active) (PXR)

At Step 1, italics indicate the part of speech, and italics in parentheses indicate the base forms. Definitions: CD, cardinal numeral; DT, determiner; IN, preposition; MD, modal; NN, noun; NNP, proper noun; VB, verb, base form; VBG, verb, gerund or present participle. At Step 2, bold indicates chemical or PXR names listed in dictionaries. At Step 3, single-underlines indicate noun groups, and wave-underlines indicate verb groups. At Step 4, square brackets [] indicate noun phrases, and parentheses () indicate verb phrases. At Step 5, shaded text indicates noun phrase groups, and curly brackets { } indicate verb phrase groups. At Step 6, clauses involving relationships between chemicals and PXR are reconstructed. At Step 7, chemical-PXR interactions are extracted by pattern matching based on the order of keywords.

1-d PubMed 要旨からの化合物-P-gp 間相互作用情報の抽出

トランスポーターP-gp に関しても同様に動詞リスト(Table 3)を改変し情報の抽出を行った。検索キーワードには P-gp 名及び同義語 (ABCB1, MDR1 など)を用い PubMed で検索を行うことで、21509 個の P-gp 関連の要旨全文を取得した。これらの要旨に対してテキストマイニングを行ったところ、得られたレコードは基質、誘導剤、阻害剤に対してそれぞれ、3244、669、2939 個であった。PXR の際と同様にレコードの重複を削除した。一方、テキストマイニングシステムの妥当性を確認するために、200 個の要旨を無作為に選んで評価したところ、化合物名識別においては再現率が 89.8%、適合率が 84.2%、化合物-P-gp 相互作用抽出においては再現率が 71.7%、適合率が 78.6%という性能が得られた。相互作用情報の抽出に関してはやや精度が低かったために、文献に遡って情報の精査を行い、最終的には 334 個の基質、104 個の誘導剤及び 310 個の阻害剤が得られた。

Table 3. Verbs and verbal nouns used for classification of data sets into substrates, inducer and inhibitor of transporters

Category	Verbs and verbal nouns
Substrate	accumulate, stimulate, transport, accept, recognize, mediate, substrate, uptake
Inducer	induce, inducer, up-regulate, upregulate
Inhibitor	inhibit, inhibitor, down-regulate, downregulate

1-e TP-Search データベースとの比較

得られたデータをトランスポーターデータベースである TP-Search²⁵ のデータセットと比較した。TP-Search には 747 個の化合物-P-gp 相互作用情報 (280 基質、38 誘導剤、429 阻害剤) が収載されている。TP-Search と本解析で得たデータで共通する化合物数は 222 個 (105 基質、15 誘導剤、102 阻害剤)であった。これは、本解析で得た 748 個の内の 526 個 (229 基質、89 誘導剤、208 阻害剤)が TP-Search データベースにない化合物であることを示し、テキストマイニングの有用性が確認できた。

1-f P-gp 基質と CYP3A4 基質間の共起の評価

P-gp と CYP3A4 は基質選択性に共通性があり、小腸における薬物吸収に対するバリアと

して協奏的に働くことが示唆されてきた^{26,27}。しかし、それを述べた論文に収載される化合物の数は必ずしも多くなく、その信憑性には疑問が残される。そこで著者の研究室が以前にテキストマイニングして得た CYP のデータセット²⁴と今回収集した P-gp のデータセットを比較し、P-gp と CYP3A4 の基質の共起を評価した。そのためにまず過去に得た CYP のデータセットの情報を精査し、CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4 の基質はそれぞれ 147、95、86、159、95、283 個であることを確認した。重複を整理し CYP3A4 以外の基質を数えたところ総数は 266 個となり、CYP3A4 基質数と同等であった。Table 4 には、P-gp と各 CYP 分子種間における基質の共起を Jaccard-Tanimoto 類似性指標を基に評価した結果を示した。この結果、P-gp は他の CYP 分子種よりも CYP3A4 と多くの基質を共有することが示された。

Table 4. Frequency of dual substrates of P-gp and CYP isoforms

	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4	non-CYP3A4 ^a
Number of CYP substrates ^b	147	95	86	159	95	283	266
Number of P-gp/CYP dual substrates ^c	23	19	15	37	7	78	24
Jaccard-Tanimoto similarity indices ^d	0.050	0.046	0.037	0.081	0.017	0.145	0.041

^aSum of the number of substrates listed in the database for the 5 non-CYP3A4 isoforms (CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 2E1), without duplication. This category does not include chemicals that are also CYP3A4 substrates: for example, chemicals that are metabolized by both CYP2D6 and CYP3A4 were not regarded as a non-CYP3A4 substrate, and therefore, the number of dual substrates for non-CYP3A4 could be less than that for CYP2D6.

^bNumber of CYP substrates obtained by curation of our previous data set (ref 20).^cNumber of dual substrates of CYP and P-gp. The total number of P-gp substrates was 334. ^dThe Jaccard-Tanimoto similarity index (JT) was calculated using the following equation:

$$J = |A \cap B| / |A \cup B|$$

Where A and B are sets of P-gp and CYP substrates, respectively.

1-g 考察

近年バイオインフォマティクス領域においてテキストマイニングシステムの利用が数多く報告されている²⁸⁻³²。しかしながらこれらの大半は遺伝子やタンパク質間の情報抽出に特化したものであり、文書構造の違いから化合物-タンパク質間相互作用に直接応用することは困難である。機械学習法等を用いた化合物-タンパク質間相互作用の抽出も試みられてきたが^{33,34}、これらの統計的方法ではアノテーション済みの大規模な情報源を学習用に準備する必要があるのに対し、しばしば検索目的に合致する情報源がないことが問題となり応用は限定される^{35,36}。一方、筆者らのシステムはルールベースを元にパターンマッチングを行うものである。このアプローチには情報抽出のための頑健なルールが必要となるが、既に行った CYP に関する情報抽出において基盤が構築されており^{23,24}、今回、動詞リストとタンパク質名リストの変更によって化合物と PXR の相互作用情報が抽出できると考えた。改変したシステムからは 868 個のレコードが得られ、重複を除いても 169 個の化合物-PXR 間相互作用に関する情報を得ることが出来た。さらに、本システムは化合物名の識別、及び相互作用情報の抽出に対して十分に高い性能を有することが確認された。

また本システムを他の機能性タンパク質である P-gp に対しても適用した。相互作用情報抽出の精度は PXR の場合ほど高い値は得られなかったが、最終的にキュレーションを行った後でも 334 個の基質、104 個の誘導剤及び 310 個の阻害剤が得られた。得られた情報の有用性を検討するため、解析によって得られたデータと TP-Search データベース²⁵に収載される P-gp 関連のレコードを比較した。TP-Search はトランスポーター研究のエキスパートによって収集されたトランスポーターデータベースであり、75 種を超える細胞膜トランスポーターとそれらの基質、誘導剤、阻害剤の情報を含んでいる。今回のテキストマイニング解析によって得られた情報には TP-Search が最後にアップデートされた 2007 年 6 月 26 日以降に公開された論文の要旨から得た情報の 271 個も含まれるが、全体として TP-Search データベースにない 526 個の化合物-P-gp 間相互作用情報を得ることが出来た。逆に 525 個の TP-Search データベースの相互作用情報が収集できなかったが、理由の一つとして PubMed 要旨のみ解析したことが考えられた。実際、収集できなかったもののうち 37% は解析した文章セット中に存在しない化合物であった。他の問題は、本解析では P-gp 名と化合物名が同一の文中にある場合しか情報収集できない点であり、複数の文の関係を解析する技術は今後の課題である。

CYP3A4 は消化管にも発現し、P-gp と同様に様々な薬物の経口吸収を制限することが知られている。さらに、この P-gp と CYP3A4 の間で基質が類似することから、“intestinal recycling” の概念が提唱されている^{26,27,37,38}。これは、薬物が小腸を通過する過程において上皮細胞への取り込みと P-gp による管腔内への排出を繰り返すことにより、薬物が上皮細胞内での CYP3A4 による代謝を受ける機会が増大し血流への吸収が大きく制限されるという考えである。さらにシミュレーション研究では CYP3A4 と P-gp の生理学的な分布パターン(つまり、CYP3A4 の発現は近位小腸側が高く、一方で P-gp は遠位小腸側に多い)が P-gp/CYP3A4 に共通する基質の経口吸収を制限するのに適していることも示されている³⁹。

しかし、P-gp と CYP3A4 の基質選択性が類似する点⁴⁰については統計的な評価は行われておらず、その確証には至っていなかった。そこで、本研究において、以前テキストマイニングによって収集した CYP 分子種の基質情報²⁴を精査し、Jaccard-Tanimoto 指数に基づいて P-gp 基質との類似度を評価したところ (Table 4)、確かに P-gp と CYP3A4 との間で基質が類似し、過去に提唱された概念を支持する結果が得られた。

以上、本節ではテキストマイニングシステムシステムを改変することで、化合物と PXR あるいは P-gp との相互作用に関する情報を効果的に収集できることを確認した。PXR に関しては 169 個の相互作用化合物に関する情報が得られたので、以降の研究ではこれらの情報を構造活性相関解析に活用した。

第二節 PXR 活性に関する構造活性相関解析

本節では、過去に PXR の構造活性相関解析に用いられたデータセットに加え、前節で得られたテキストマイニング情報、公開スクリーニングデータを加えることで、大規模なデータセットを構築し、再帰分割法による PXR 活性予測モデルの構築を行った。

2-a 構造活性相関解析用のデータセットの構築

前節のテキストマイニングで得られた化合物に対して、ヒト PXR との相互作用に絞って文献上での情報の精査を行ったところ、ヒト PXR アゴニストは 67 個、非アゴニストは 15 個であった。予想された通り、文献から非アゴニストに関する情報を得ることは困難であった。そこで、このデータに PubChem BioAssay データベースに収載されるヒト PXR レポーターアッセイ系でのスクリーニングデータ、過去の構造活性相関研究で用いられたデータセット^{15,20}を併せた。重複する化合物を削除したところ、最終的には 270 個の PXR アゴニストと 248 個の非アゴニストとからなるデータセットが作成された。

構造活性相関解析に先立って、まず構築した化合物データセットの多様性を確認するために、化合物の二次元構造式に基づき ADMET Predictor 分子記述子を計算し、主成分分析を行った。Fig. 1 は、得られた第一主成分及び第二主成分を散布図プロットした結果を示したものである。非アゴニストの多くが PubChem BioAssay から得たデータであったが、PXR アゴニストと非アゴニストの分布に明確な違いはなく、データセット全体にも大きな偏りはないことが確認できた。

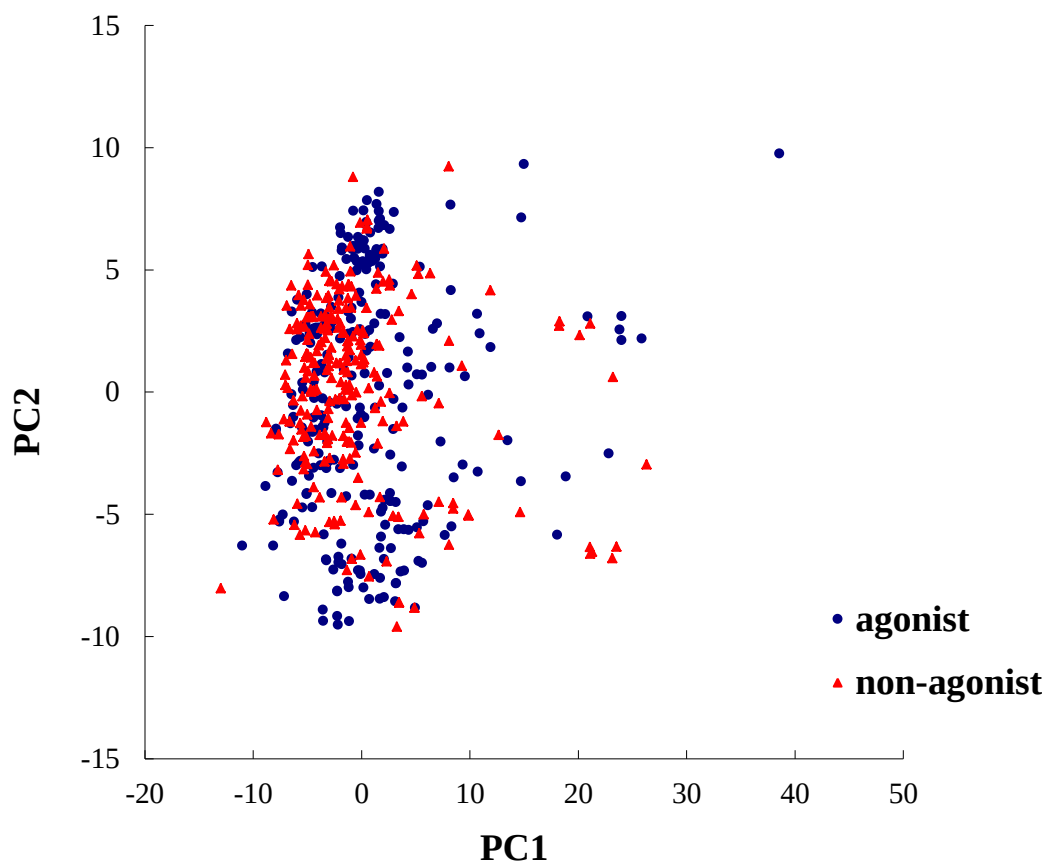


Fig. 1 Principal component score plots for human PXR agonists and non-agonists

The numbers of PXR agonists (blue circles) and non-agonists (red triangles) are 270 and 248, respectively. Molecular descriptors of the compounds were calculated by ADMET Predictor 5.0, and used for principal component analysis after highly skewed descriptors (skewness measure of >5.0) were removed. One hundred sixty-one of 335 molecular descriptors were used. The cumulative contribution rates were 24.6% and 36.1% for the first and second principal components.

2-b 再帰分割法による PXR アゴニストの構造活性相関解析

PXR アゴニストと非アゴニストを識別する構造的因子を解明するために、詳細な構造活性相関解析を行った。データセットを 4:1 の比率で訓練データとテストデータに分割し、415 個の化合物 (217 個のアゴニスト、198 個の非アゴニスト) からなる訓練データを用いて再帰分割法による解析を行った。Fig. 2 は、分割を再帰的に繰り返し訓練データ内での交叉検証により剪定を行って最適化した決定木モデルを示す。モデルは 5 つの分岐ルールと 6 個の末端ノードからなり、最終的な訓練データによる内部予測率は 79.0%であった。

分割基準に選ばれた分子記述子の多くは分子の電荷に関するものであった。炭素原子上の π フクイ指数の絶対値の合計 (Pi_AFPIc) が 20.12 より大きいと PXR アゴニストになりや

すいという結果となった。PXR アゴニストの 87.2%はこのカテゴリーに分類された。Table 5 には、テストデータによるモデル外部検証の結果を示した。全体の予測精度は 70.9%で、感度、特異度はそれぞれ、67.9%、74.0%となった。

データ構造を直観的に理解するために、平安京ビューによって分類データの表示を行った(Fig. 3)。平安京ビューは多階層情報を可視化する技術であり、階層情報を長方形の枠で、末端のデータをカラーアイコンで表す。先に言及した結果とは別に、Pi_AFPIc が 20.12 以下で且つ、芳香族性結合の全結合に対する割合(F_AromB)が 0.365 以上の化合物が PXR アゴニストになりにくい(29.3%)ということが視覚的に明らかとなった。

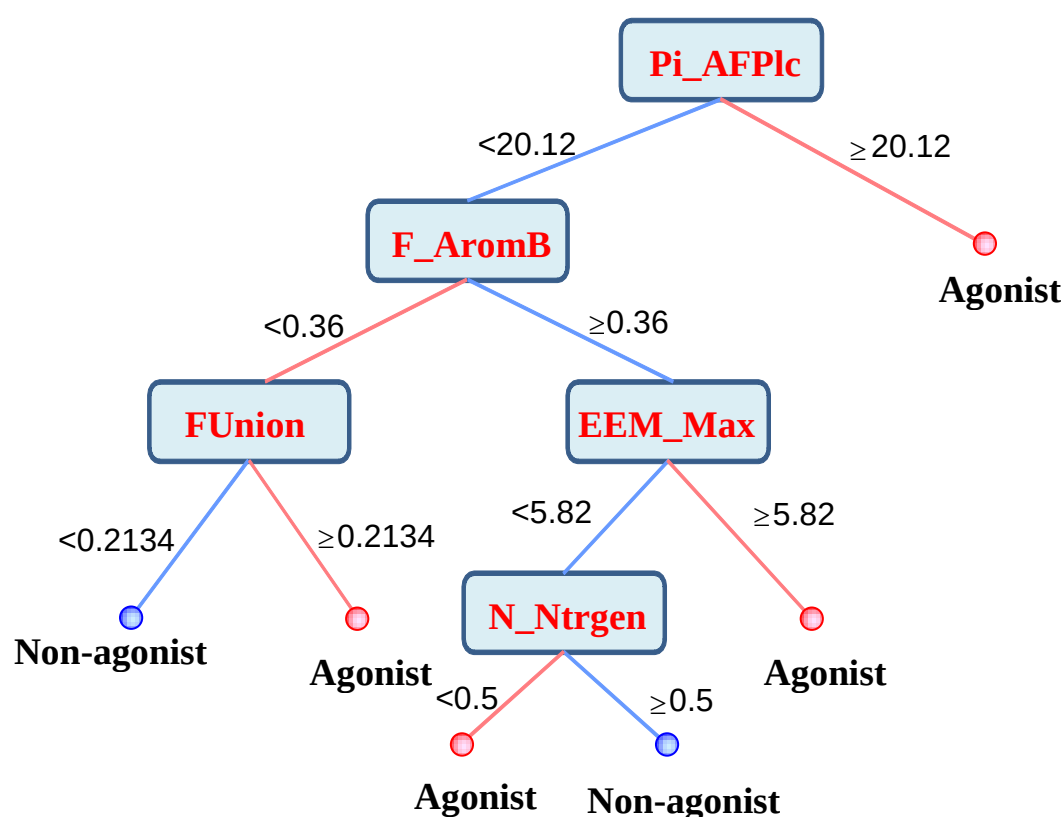


Fig. 2 Classification tree model for human PXR activators

The model was developed by a recursive partitioning method, where the Gini indices were used for determination of each splitting criterion. Keys: EEM_MaxF, maximum sigma Fukui index; F_AromB, aromatic bonds as fraction of total bonds; FUnion, fraction unionized at pH 7.4; N_Ntrgen, number of nitrogens in molecule; Pi_AFPIc, sum of absolute values of pi Fukui(+) indices on C atoms.

Table 5. Accuracy of prediction for classification tree model of PXR agonists

Training data				
		Experimental		
		PXR (+)	PXR (–)	Sum
Predicted	PXR(+)	170	40	210
	PXR(–)	47	158	205
	Sum	217	198	415
Testing data				
		Experimental		
		PXR (+)	PXR (–)	Sum
Predicted	PXR(+)	36	13	49
	PXR(–)	17	37	54
	Sum	53	50	103

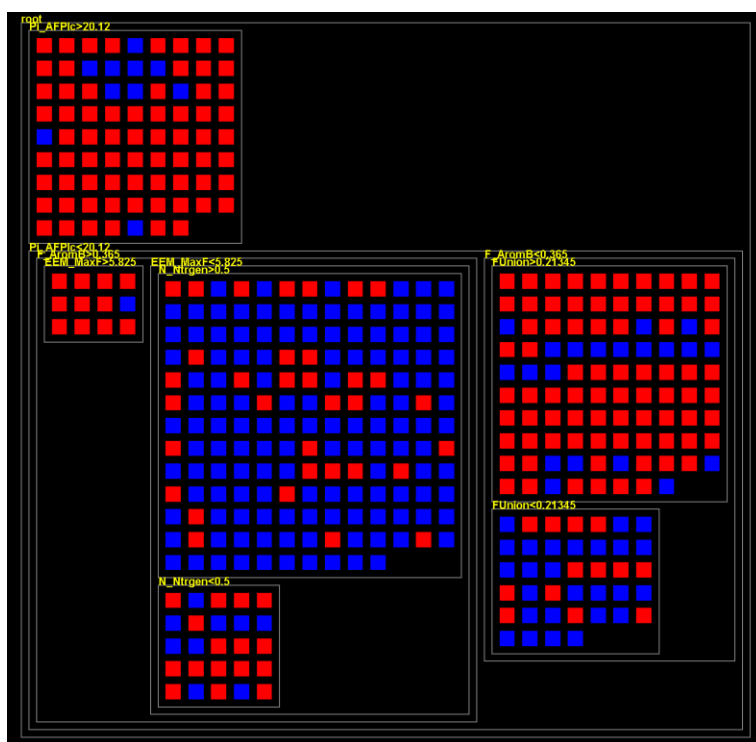


Fig. 3 Heiankyo View representation of classification results

Red and blue colored icons represent PXR agonists and non-agonists, respectively. Nested rectangular borders correspond to the hierarchical structure of the classification tree model.

2-c 考察

過去に Khandelwal ら¹⁵は、Ung ら²⁰が用いた 177 個の化合物から成るデータセットを再解析し、145 個の大きな評価セットを用いた検証を行うことで構造活性相関モデルが合理的な精度で予測できることを示した。しかし、こうした経験的モデルの汎化性は、一般にデータセットの大きさに依存する。本研究ではまず、テキストマイニングによって 67 個の PXR アゴニストと 15 個の非アゴニストを検出したが、この内 36 個(32 個のアゴニスト、4 個の非アゴニスト)は Khandelwal らのデータセットに無い化合物であった。さらに、これに PubChem BioAssay で公開されているスクリーニングデータを加えることで、270 個の PXR アゴニストと 248 個の非アゴニストから成る過去の文献と比べても十分に大きなデータセットを構築した。

解析に用いたデータの多くは PXR レポーター遺伝子アッセイによるものであるが、Luo ら⁴¹はヒト PXR レポーター遺伝子アッセイの結果はヒト肝細胞における CYP3A4 誘導データと相関することを明らかにしている。さらに Cui ら⁴²は 20 個の臨床で用いられている医薬品に関して PXR レポーター遺伝子アッセイを行い、この方法によって化合物の臨床での CYP3A4 誘導の可能性を十分に予測できることを示した。彼らはさらに、レポーター遺

伝子アッセイはヒト動態データがまだ利用できない、リード最適化段階におけるスクリーニング技術として用いることが出来ると報告した。本解析ではテキストマイニングで収集した質的データとレポーター遺伝子アッセイによるスクリーニングデータを統合したが、テキストマイニングによって得られた 82 個の化合物の内、実験により ED₅₀ 値を得ることが出来た 46 個の化合物に関してレポーター遺伝子アッセイの分類結果と比較したところ、誤分類された化合物は 46 個中 5 個に留まった。これは再帰分割解析によるモデル構築に対して支障がない程度と判断し、構造活性相関解析を実行した。

本解析で再帰分割法により得られた決定木モデルの外部予測精度は 70.9%であった。Khandelwal ら¹⁵は 3 つの機械学習法を用いて PXR 活性予測モデルの構築を行い、予測精度はサポートベクターマシーンが 66.9%と、再帰分割法(63.45%)やランダムフォレスト(65.52%)と比べて高いと報告している。彼らのデータセットは今回とは異なるため一概に比較はできないが、大凡同程度の精度のモデルがより大規模なデータセットで構築できたと考えられる。本解析において再帰分割法を選択した理由は、直観的で結果の解釈が容易なモデルを得ることができ、さらに単純な分岐ルールとの組み合わせであるにもかかわらず非線形関係も表現できるからである。再帰分割法は薬効診断や、系統分類、心理分析や情報検索など様々な分類予測問題の解決に対して広く用いられてきた。構造活性相関解析においても、生物学的活性^{21,43}、毒性⁴⁴、物性⁴⁵⁻⁴⁷、薬物吸収^{48,49}、代謝^{24,45,50} などに関する報告があり、多様な問題に対して応用できる優れたモデル化技術の一つである。

平安京ビューは著者の所属する研究室で開発された大規模情報可視化技術であり^{45,51,52}、階層的なデータを色のついたアイコンで表し、長方形の枠で囲むことによって表示する。平安京ビューでは最適な表示レイアウトを見つけるために、1)長方形の枠が破れない、2)配置された枠を囲む長方形の枠の領域面積が最小である、3) 長方形の縦横比が可能な限り正方形になるよう枠を作る、の 3 つの条件を満たしている。平安京ビューは階層的なデータを一望できるため、決定木モデルの適合度の評価に非常に適している。本解析で構築した化合物-PXR 間相互作用予測のための決定木モデルは 79.0%の予測精度であったが、これを直観的に捉えることが出来た(Fig. 3)。

これまでに、異なるリガンドと結合した PXR の X 線結晶構造がいくつか報告されている^{11,12}。PXR リガンド結合部位はほとんどが疎水性アミノ酸残基によって構成されており、数個の極性残基がある。Xiao らは近年、37 個の化合物とのドッキングスタディーから疎水性相互作用の他、分子量及び形状が PXR との結合の主要な決定因子であること、特にリガンドと PXR 間の芳香族間相互作用と水素結合が強力な結合に重要であることを報告した⁵³。その結合において水素結合が重要であることは、他のドッキングスタディーによる解析^{13,14,16}やファーマコフォア解析^{18,19,22}からも報告されている。本解析によって得られた決定木モデル(Fig. 2)は、最初に分岐基準から Pi_AFPIc が 20.12 以上であると PXR アゴニストになりやすいことを示している。この分子記述子は C 原子におけるπフクイ指標に関する分子記述子であり、分子の不飽和結合数と相関する。解析に用いた化合物全体での Pi_AFPIc の値の平均が 13.15 であるのに対し、この指標によって分類された PXR アゴニストが高い Pi_AFPIc 値を示すことから、これらのアゴニストは他の化合物と比べて多くの不飽和結合

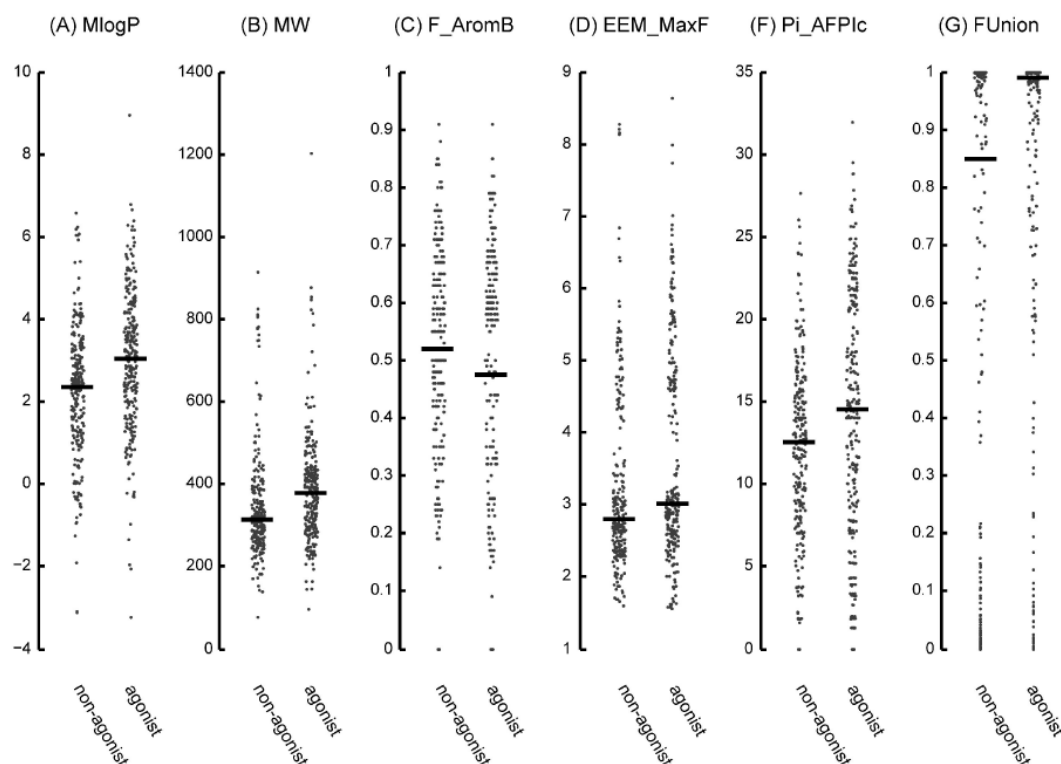


Fig. 4 Comparison in molecular descriptors between PXR agonists and non-agonists

Individual data points and their median are shown in each figure. Keys: MlogP, Moriguchi LogP; MW, molecular weight; F_AromB, aromatic bonds as fraction of total bonds; EEM_MaxF, maximum sigma Fukui index; Pi_AFPIc, sum of absolute values of pi Fukui(+) indices on C atoms; FUnion, fraction unionized at pH 7.4.

をもっており、リガンド結合ドメインの芳香族アミノ酸残基と π - π 相互作用をしているものと考えられる。

分割基準に用いられた分子記述子と Moriguchi Log P (MlogP)及び分子量(MW)に関して、PXR アゴニストと非アゴニスト間で差があるかを検討した(Fig. 4)。PXR アゴニストは非アゴニストに比べより疎水的であることが示され、これは過去の報告とも一致している⁵³。Pi_AFPIc 値の有意な違いに加えて、アゴニストの FUnion 値平均は 0.991 で、非アゴニストの平均は 0.849 であることから、多くの PXR アゴニストは非イオン性の化合物であることが分かった。このことから電荷をもつ化合物は PXR との間でエントロピー駆動型である疎水性相互作用を引き起こしにくいことが示唆された。

以上、本節においては、テキストマイニングシステムを用いることによって得られたデータセットにスクリーニングデータ及び文献中のデータを加えることで PXR アゴニスト及び非アゴニストの大きなデータセットを構築し、再帰分割法による構造活性相関解析を行った。解析の結果得られた決定木モデルからは高い精度での予測が可能である他、PXR 活性には疎水性相互作用、特に π - π 相互作用が重要であることが示された。

第二章 リファンピシン併用による CYP3A4 誘導を起因とする臨床薬物間相互作用予測モデルの構築

第一章においては創薬研究初期の分子設計に対する *in silico* 予測モデルの構築という点から研究を進めてきたが、その後の開発候補化合物の選定では臨床薬物動態を予測し開発の成功可能性を見極めることが重要である。薬物動態では種差の問題が大きくアニマルスケールアップが困難な現状において、ヒトの組織あるいは細胞を用いた *in vitro* 実験からの補外予測への期待が大きくなっている。

これまでに *in vitro* データを用いて臨床 DDI の可能性を予測するための様々な数理モデルが報告されてきた⁵⁴⁻⁵⁷。しかし、誘導の研究は遺伝子の転写とタンパク質の発現を評価するための細胞ベースの実験システム構築を要するため、一般に阻害の研究と比べて実施するのが難しい。最も単純なモデルは *in vitro* 実験によって得られた EC_{50} と E_{max} の推定値を用いて、誘導剤の血漿中濃度の平均から静的な誘導率を求めるものである^{58,59}。特定の薬物との併用に対する誘導による DDI の可能性は、誘導される酵素に起因する薬物の全身クリアランスの割合に基づいて予測される。一方、動的モデルは酵素活性レベルの変動を考慮し⁶⁰⁻⁶²、基質薬物のクリアランスは、誘導剤の濃度依存的に酵素の合成が促進されることによって動的に変化するものと仮定する。近年の研究では動的モデルは、静的モデルと比べて目立った改善はないにもかかわらず、50 例の臨床 DDI 試験の結果に対しより適切に予測できたことが示されてきた⁶³。

今まで報告されてきた動的モデルは全て PK/PD 解析でしばしば用いられる間接効果モデルであり⁶⁰⁻⁶²、誘導剤が濃度依存的に酵素合成を促進することを想定している。ここでは酵素合成が 0 次反応に従うと想定しており、誘導剤の酵素合成に対する作用は速やかに開始する。それゆえ、誘導剤を数日間添加した際の CYP 活性の緩やかな上昇は、単純に酵素の分解速度が遅いことに起因すると仮定する。しかしながら、いくつかの研究において mRNA 発現がピークに達するには少なくとも数日かかることが示されてきた^{64,65}。酵素誘導の動態を評価するためには mRNA と酵素の逐次的な合成に対して時間推移を考慮することが重要である。

そこで本章においては、誘導による臨床 DDI を動的に予測するために、転写・翻訳過程を含めた動的酵素誘導モデルと生理学的速度論モデルを各モジュールとして開発し、これらを連成してシミュレーションする環境を構築した。

第一節 動的 CYP3A4 誘導モデルによる薬物間相互作用の予測

モデルによるシミュレーションを行うにあたっては、より実体に即したモデルを構築することが重要である。そこで、本節では CYP3A4 誘導に関して転写・翻訳過程を考慮した詳細な動的酵素誘導モデルを構築し臨床における DDI の予測を試みた。ここで、臨床で起こる DDI に対して動的モデルを考えるためには、誘導剤および基質薬物が生体に投与されたときの薬物動態を数理モデル化することも必要である。この際よく用いられるのは生理学的薬物速度論(PBPK)モデルであり、生化学的パラメータ(薬物代謝、排泄、蛋白結合)と生理解剖学的パラメータ(組織体積、血流速度)を用いて薬物動態を記述することで、実体に即した *in vitro* から *in vivo* への補外が可能となる。そこで PBPK モデルによって臨床薬物動態を解析し、これを誘導動的モデルと連結させた DDI 予測モデルを構築した。

リファンピシンは、各種テスト化合物の CYP3A4 誘導能を評価する上でポジティブコントロールに用いられる代表的な CYP3A4 誘導薬である。リファンピシンに関する多くの *in vitro* 誘導実験データを文献から利用できることから、これをモデル薬物として解析を行った。一般に *in vivo* での状態をシミュレーションするためには *in vitro* モデルとしてヒト肝細胞が用いられるが、肝細胞ロット間には大きな機能的な変動があることが知られている^{66,67}。そこで、文献情報を収集した統合解析にあたり、パラメータの個体間、個体内変動を考慮できる拡張最小二乗法を用いることとした^{68,69}。得られたヒト肝細胞での酵素誘導パラメータを用いてリファンピシン併用時における CYP3A4 基質薬物の臨床薬物動態を予測した。

1-a 転写・翻訳過程を考慮した動的 CYP3A4 誘導モデルの構築

まず、転写・翻訳過程を考慮した動的 CYP3A4 誘導モデルの構築を行った。リファンピシンによる CYP3A4 の発現誘導は PXR を介して行われると仮定し、動的モデルは下の式で表される。

$$\frac{dPXR_{act}}{dt} = \frac{1 + CYP_0/K_i}{1 + CYP/K_i} \cdot \frac{RIF}{EC_{50} + RIF} - k_{inact} \cdot PXR_{act} \quad (1)$$

$$\frac{dRNA}{dt} = k_{rna,syn} + k_{rna,pxr} \cdot PXR_{act} - k_{rna,deg} \cdot RNA \quad (2)$$

$$\frac{dCYP}{dt} = k_{cyp,syn} \cdot RNA - k_{cyp,deg} \cdot CYP \quad (3)$$

ここで、RIF、 PXR_{act} 、RNA、CYP はそれぞれリファンピシン濃度、標準化した活性化 PXR 量、CYP3A4 mRNA 発現量、CYP3A4 タンパク量であり、 CYP_0 、 EC_{50} 、 K_i 、 k_{inact} はそれぞれ CYP3A4 の定常状態での発現量、リファンピシンによる PXR 活性化の 50% 効果濃度、ネガティブフィードバック阻害定数、活性化 PXR の不活化速度定数である。また、 $k_{rna,syn}$ と $k_{rna,pxr}$ は CYP3A4 mRNA の定常状態における合成速度定数、及び活性化 PXR 依存的合成速度定数であり、 $k_{rna,deg}$ は分解速度定数である。同様に $k_{cyp,syn}$ 及び $k_{cyp,deg}$ は CYP3A4 タンパク質の合成及び分解速度定数である。本モデルにおいて、CYP3A4 mRNA 発現上昇の誘導剤添加後初期における遅れは PXR 活性化に必要な時間によるものと仮定し、mRNA の分解の促進は活性化 PXR による CYP3A4 発現の上昇に伴うネガティブフィードバック阻害に起因すると仮定した。一般的に、mRNA の上昇とそれに伴う CYP3A4 タンパク質の上昇は、投与開始時(day 0)に対する上昇比で評価される。そこで mRNA 量及びタンパク質量がリファンピシン刺激を除いた後に元の値(それぞれ RNA_0 、 CYP_0)に戻ると仮定して、以下の式を導いた。

$$k_{cyp,syn} \cdot RNA_0 = k_{cyp,deg} \cdot CYP_0 \quad (4)$$

$$k_{rna,syn} = k_{rna,deg} \cdot RNA_0 \quad (5)$$

ここで、 $RNA' = RNA/RNA_0$ と $CYP' = CYP/CYP_0$ とすると、式(1)~(3)は以下の式に置き換えられる。

$$\frac{dPXR_{act}}{dt} = \frac{1+p}{1+p \cdot CYP'} \cdot \frac{RIF}{EC_{50} + RIF} - k_{inact} \cdot PXR_{act} \quad (6)$$

$$\frac{dRNA'}{dt} = k_{rna,deg} \cdot (1 + q \cdot PXR_{act} - RNA') \quad (7)$$

$$\frac{dCYP'}{dt} = k_{cyp,deg} \cdot (RNA' - CYP') \quad (8)$$

$$p = CYP_0 / K_i \quad (9)$$

$$q = \frac{k_{rna,pxr} \cdot k_{cyp,syn}}{k_{rna,deg} \cdot k_{cyp,deg} \cdot CYP_0} \quad (10)$$

24 個の異なる文献から収集した 43 の CYP3A4 活性データと 40 の mRNA データを用いて、式(6)~(8)に対するパラメータ推定を行った。 EC_{50} 、 k_{inact} 、 $k_{rna,deg}$ 、 $k_{cyp,deg}$ 、 p 、 q はそれぞれ $1.18\mu M$ 、 $0.0530h^{-1}$ 、 $0.0282h^{-1}$ 、 0.313 、及び 4.34 となった。CYP₀ に対する個体内変動 (ω^2) は 0.318 であった。Fig. 5 にはリファンピシン濃度、時間に対する CYP3A4 活性と mRNA 発現量の推定曲面を示した。mRNA 量はリファンピシン投与開始後約 40 時間で最大となり、これに遅れて CYP3A4 活性が最大となった。

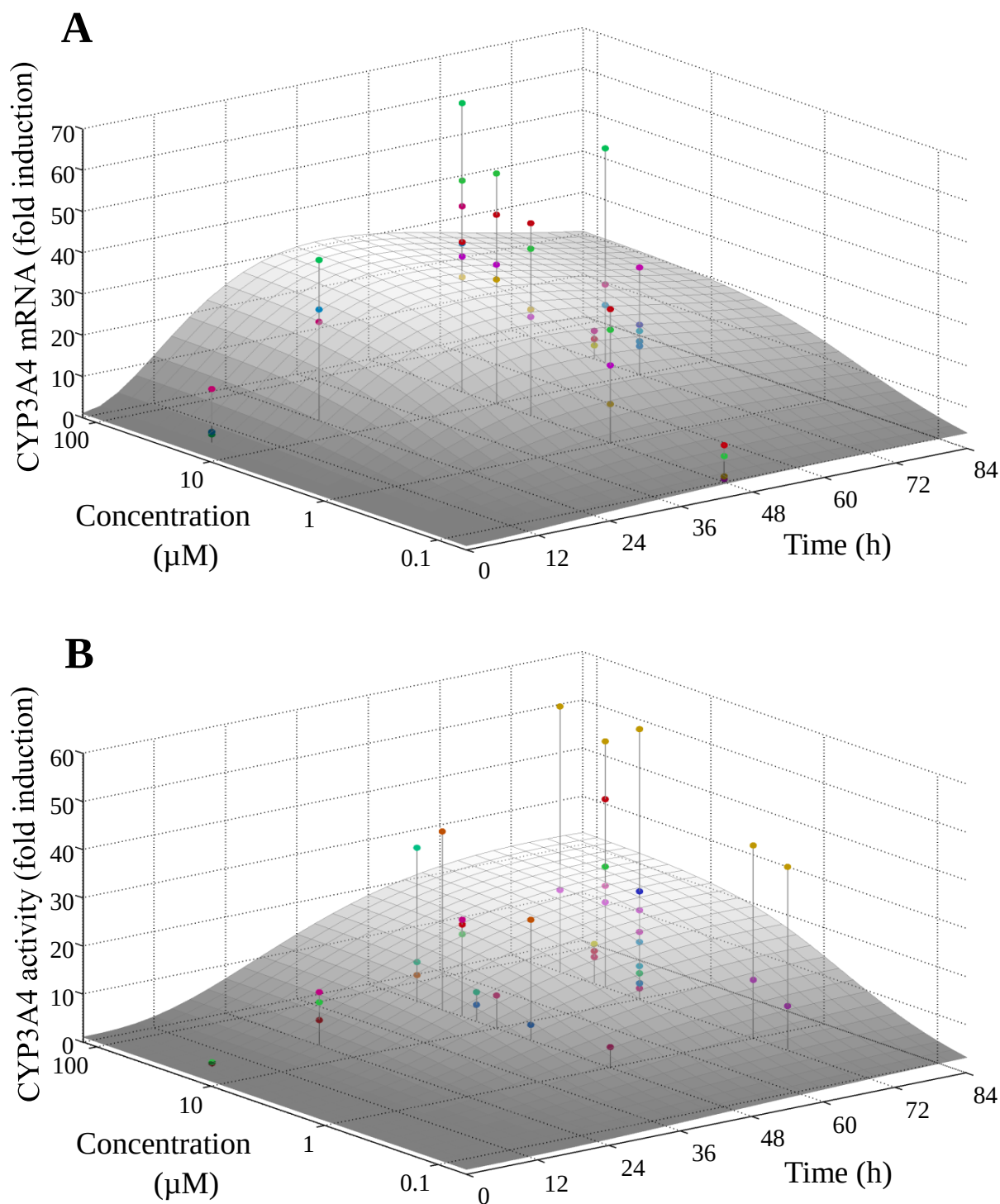


Fig. 5 Curve-fitting to experimental data of the induction of CYP3A4 by rifampicin in human hepatocytes

Fig. 5A represents the relative fold induction of CYP3A4 mRNA, while Fig. 5B represents that of the protein level determined by enzyme activity measurements. The data for each donor is presented in a different color. The baseline-normalized data and corresponding equations, i.e., Equations 6–8, were used for this analysis, assuming that inter-individual variability for induction is because of differences in baseline CYP3A4 activity. The surface curves represent the averages.

1-b CYP3A4 活性誘導に関する間接効果モデルの構築

比較として、従来から用いられてきた間接効果モデルの構築を行った。酵素誘導の間接効果モデルは次の式で表される。

$$\frac{dCYP}{dt} = k_{syn} \cdot \left(1 + \frac{E_{max} \cdot RIF}{EC_{50} + RIF} \right) - k_{deg} \cdot CYP \quad (11)$$

k_{syn} と k_{deg} はそれぞれ、定常状態における CYP3A4 タンパク質の合成速度定数と分解速度定数である。リファンピシン投与前の CYP3A4 タンパク質の量(CYP_0)は定常状態にあると仮定すると、以下の関係が成り立つ。

$$k_{syn} = k_{deg} \cdot CYP_0 \quad (12)$$

(11)式の k_{syn} に代入し、標準化した CYP 値($CYP' = CYP/CYP_0$)にすると

$$\frac{dCYP'}{dt} = k_{deg} \cdot \left(1 + \frac{E_{max} \cdot RIF}{EC_{50} + RIF} - CYP' \right) \quad (13)$$

となる。この式に関して E_{max} に個体間変動を考慮し解析を行った。しかしながら、本モデルにおいて、同時当てはめ計算により全てのパラメータを推定することはできなかった。その原因として、 k_{deg} の推定には最大に誘導がされた段階における詳細な観測値が必要と考えられたため、代替案として k_{deg} に関しては文献値^{70,71}を用い、 EC_{50} と E_{max} を当てはめ計算により求めた。 k_{deg} 値を simCYP の初期設定値($0.0072h^{-1}$)とした際の EC_{50} 及び E_{max} はそれぞれ、 $0.283\mu M$ 、 37.1 となり、 $\omega_{E_{max}}^2$ は 0.726 であった。一方、in vitro-in vivo 補外に関する別の報告で修正された k_{deg} 値($0.03h^{-1}$)を用いた際には、 EC_{50} 及び E_{max} はそれぞれ、 $0.269\mu M$ 、 16.7 となり、 $\omega_{E_{max}}^2$ は 0.702 であった。

1-c CYP3A4 活性誘導に関する静的モデルの構築

さらに静的モデルとの比較も行った。静的モデルでは 72 時間後のデータのみを用いて、リファンピシンによる CYP3A4 誘導の E_{max} 、 EC_{50} 値を以下の式より推定した。

$$CYP' = 1 + \frac{E_{max} \cdot RIF}{EC_{50} + RIF} \quad (14)$$

この式に関して $E_{\max}$ に個体間変動を考慮し解析を行ったところ、 EC_{50} 及び $E_{\max}$ はそれぞれ、 $0.281\mu\text{M}$ 、 14.8 となり、 $\omega E_{\max}^2$ は 0.874 であった。

1-d リファンピシン PBPK モデルの構築

臨床での CYP3A4 誘導を動的にシミュレーションするためには、リファンピシンの肝臓中濃度の時間推移が必要である。そこで、リファンピシンの動態特性を考慮した PBPK モデルを、以下の物質収支式で表現した。

$$V_1 \frac{dC_b}{dt} = -Q_h \cdot C_b + Q_h \cdot \frac{C_h \cdot R_b}{K_{p,h}} - CL_r \cdot C_b \quad (15)$$

$$V_h \cdot \frac{dC_h}{dt} = Q_h \cdot C_b - Q_h \cdot \frac{C_h \cdot R_b}{K_{p,h}} - \frac{V_{\max} \cdot f_{up} \cdot C_h / K_{p,h}}{K_m + f_{up} \cdot C_h / K_{p,h}} + \sum_{t_i < t} k_a \cdot F_a F_g \cdot D \cdot \delta(t_i) \cdot \exp(-k_a \cdot (t - t_i)) \quad (16)$$

$$\frac{dV_{\max}}{dt} = k_{in} \cdot (1 + F \cdot f_{up} \cdot C_h / K_{p,h}) - k_{out} \cdot V_{\max} \quad (17)$$

ここで、 C_b 、 C_h は血液中及び肝臓中における薬物濃度を表し、 $V_{\max}$ は最大肝代謝速度である。 V_1 、 CL_r 、 Q_h 、 R_b 、 $K_{p,h}$ はそれぞれ、循環血分布容積、腎クリアランス、肝血流量、血液・血漿中濃度比、肝臓・血漿中濃度比を表す。 V_h 、 f_{up} 、 K_m 、 k_a 、 $F_a F_g$ 、 D はそれぞれ、肝臓の体積、血漿中における非結合型分率、肝代謝に対する Michaelis-Menten 定数、吸収速度定数、消化管粘膜透過率と小腸アベイラビリティの積、経口投与量である。また、 k_{in} 、 k_{out} と F はそれぞれ、肝代謝能に対する生成速度定数と減衰速度定数、および自己誘導係数である。 CL_r と f_{up} は文献よりそれぞれ、 1.8L/h 、 0.2 とした⁷²。 Q_b 及び V_h は文献値よりそれぞれ、 96.6L/h 及び 1.4L とした⁵⁷。 $F_a F_g$ 及び R_b は 1 とし、 V_1 、 K_m 、 k_a 、 $K_{p,h}$ 、 k_{in} 、 k_{out} と F は異なる投与量におけるリファンピシン連続経口投与時の血中濃度時間曲線⁷³に対して同時に当てはめ計算をおこなうことで推定した。得られた k_a 、 V_1 、 K_m 、 $K_{p,h}$ 、 k_{in} 、 k_{out} 及び F 値はそれぞれ 0.963 h^{-1} 、 17.2 L 、 0.370 mg/L 、 10.6 、 0.0193 mg/h 、 $5.75 \cdot 10^{-4}\text{ h}^{-1}$ 、 8.64 L/mg であった。Fig. 6 は実測値及びシミュレーション曲線を示す。また、リファンピシン体内動態の非線形性を確認するために 300mg を 1 日 2 回投与した際(b.i.d)と、 600mg を 1 日 1 回投与した際(q.d)の AUC_{0-12h} を計算した(Fig. 7)。一日投与量は同じであっても、 300mg を 1 日 2 回投与した際の AUC は 600mg を 1 日 1 回の際と比べ非常に小さくなった。

この結果から、リファンピシンの消失仮定の飽和をうまく記述できていると考えた。また、自己酵素誘導に関しては $V_{\max}$ 値の濃度依存的な増加により記述された。

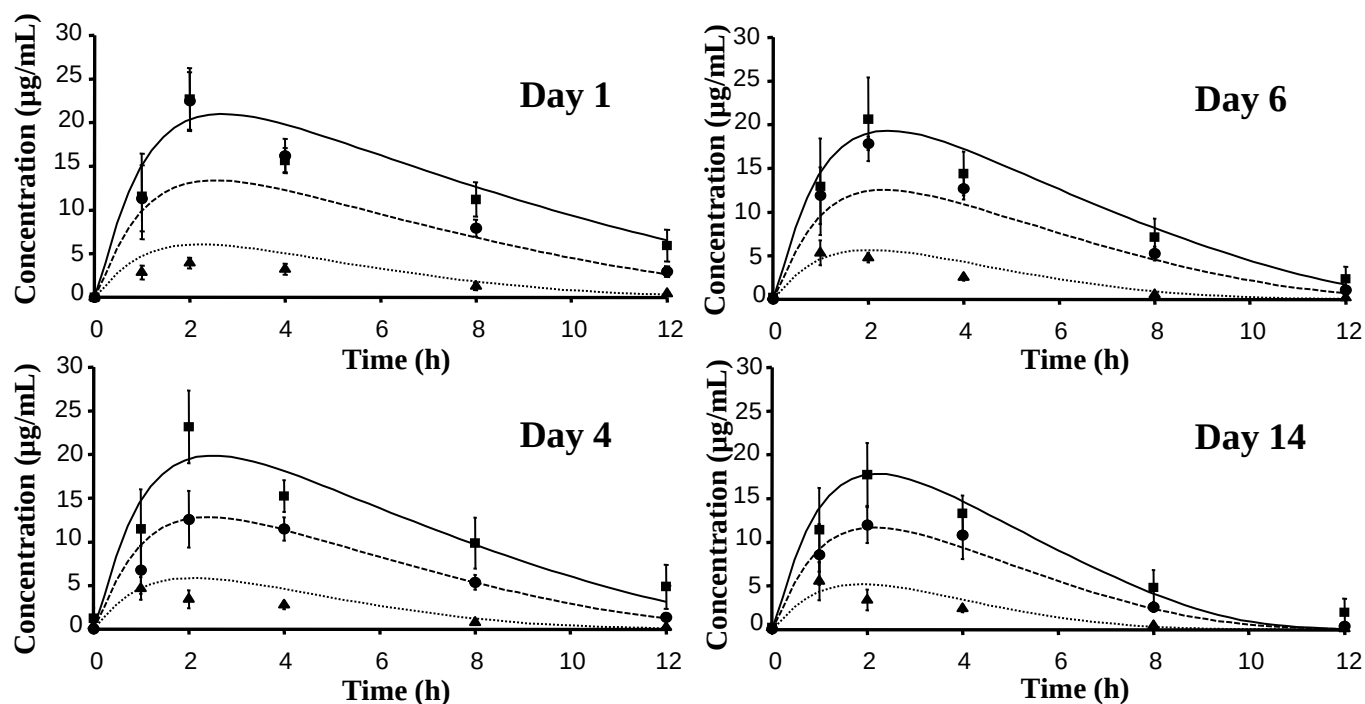


Fig. 6 Nonlinear curve-fitting to the blood concentration of rifampicin with repeated oral administration

Clinical data measured on day 1, 4, 6, and 14 (Ref. 4) were simultaneously analyzed based on a PBPK model considering an auto-inducible metabolic process (Eqs. 15–17). Theoretical curves are represented for each data set. Keys: 300 mg, b.i.d. (m, dotted line); 600 mg, q.d. (N, broken line); 900 mg q.d. (&, solid line).

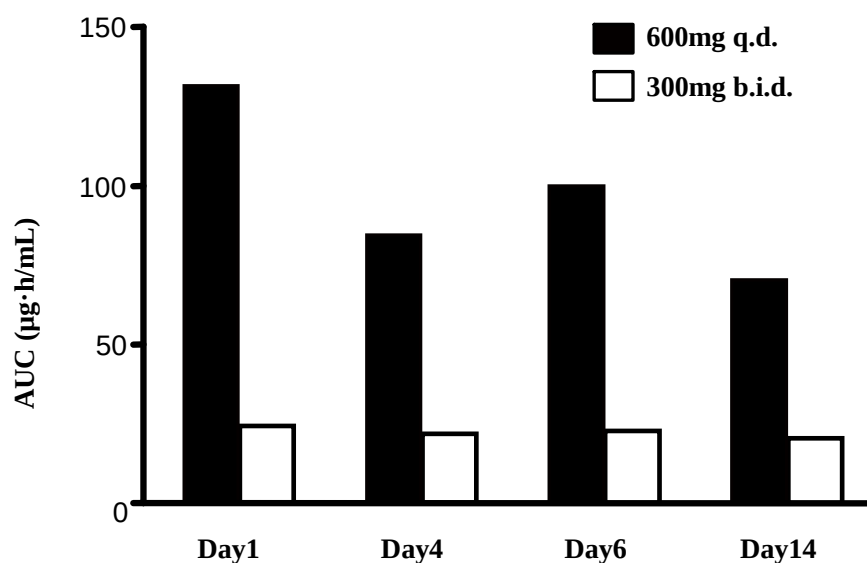


Fig. 7 AUC measurements of the blood concentration-time profile for oral rifampicin with different dosage regimens

The AUC values were calculated from clinical data (Ref. 4) using a trapezoidal method. Note that 600 mg q.d. and 300 mg b.i.d. are the same in terms of total daily dose.

1-e CYP3A4 誘導の動的シミュレーション

構築したリファンピシン PBPK モデルによって連続経口投与後時の肝臓中非結合型濃度の時間推移を推定し、これを入力関数として CYP3A4 誘導動的モデルに代入し積分することで CYP3A4 活性の変動をシミュレーションした。Fig. 8 はリファンピシンを連続で経口投与した際のシミュレーション結果を示したものである。CYP3A4 活性は徐々に増加し、4 日目に最大値を取った。そして 6 日目以降では定常状態に達した。

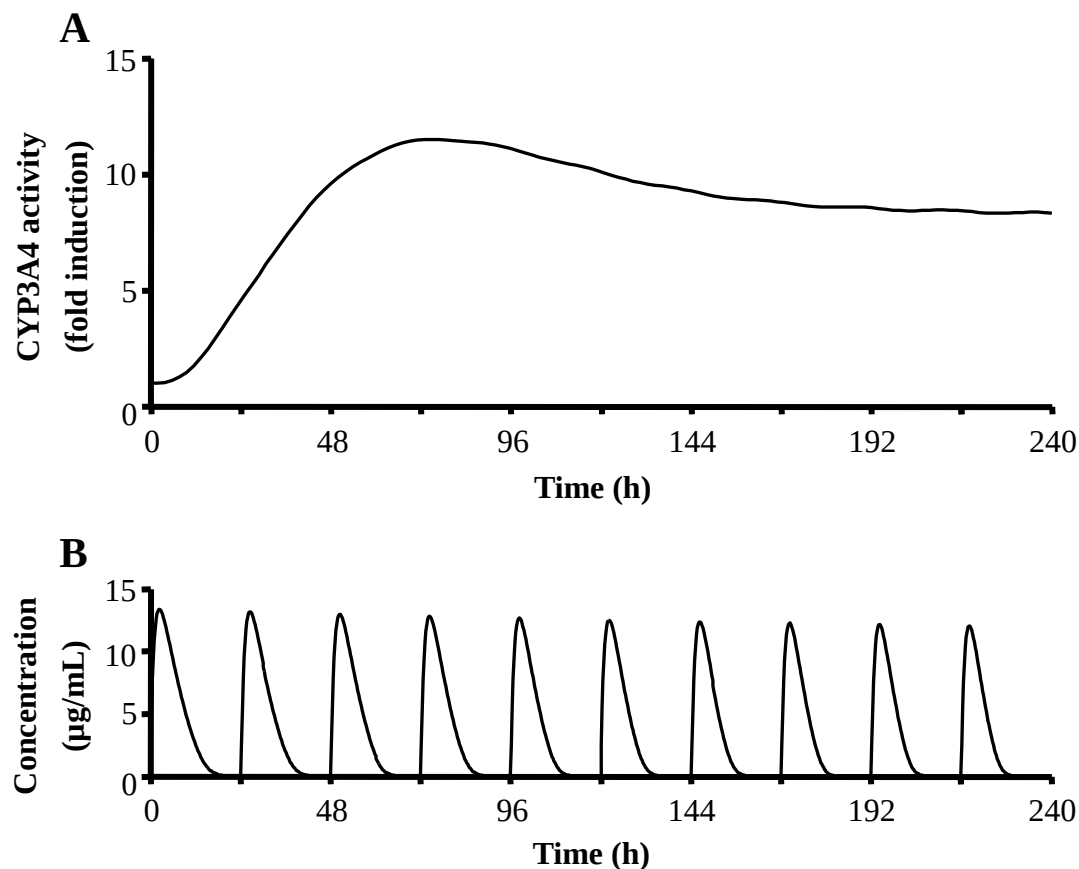


Fig. 8 Simulation of the induction of CYP3A4 following repeated oral dosing of rifampicin
 Fig. 8A represents the relative fold induction of CYP3A4 enzyme activity, while Fig. 8B represents the blood concentration of rifampicin following oral dosing of 600 mg q.d.. Equations 6–8 and 15–17 were used for this simulation.

1-f リファンピシン併用による薬物間相互作用の動的シミュレーション

前節で CYP3A4 誘導プロファイルの経時的なシミュレーションが可能となったことで、さらに基質薬物側の薬物動態モデルを構築することにより誘導が定常状態に達する前の初期段階における DDI までもシミュレーションが可能となる。そこで、まず基質の PBPK モデルをリファンピシンの式(15)~(17)を参考に構築した。ただし、基質に関しては肝消失が線形であると仮定し、式(16)の代わりに肝臓における物質収支の式を

$$V_h \cdot \frac{dC_h}{dt} = Q_h \cdot C_b - Q_h \cdot \frac{C_h \cdot R_b}{K_{p,h}} - CL_{int,h} \cdot fu_p \cdot C_h / K_{p,h} + \sum_{t_i < t} k_a \cdot F_a F_g \cdot D \cdot \delta(t_i) \cdot \exp(-k_a \cdot (t - t_i)) \quad (18)$$

と表現した。 $CL_{int,h}$ は基質に対する肝固有クリアランスを示す。リファンピシン併用の $CL_{int,h}$ は、CYP'に依存すると仮定すると

$$CL_{int,h}^{ind} = CL_{int,h}^0 \cdot (fm_{CYP3A4} \cdot CYP' + (1 - fm_{CYP3A4})) \quad (19)$$

で表される。 $CL_{int,h}^{ind}$ と $CL_{int,h}^0$ は誘導剤併用時及び非併用時における基質の肝固有クリアランスである。

ここではまず、投与初期段階における DDI データが取得可能なアルプラゾラムを例として、リファンピシン投与による CYP3A4 誘導が定常状態に達する前の初期段階における DDI をシミュレーションした。動態パラメータは血中濃度・時間曲線に対する当てはめ計算で求めた。推定したアルプラゾラムの PBPK モデルのパラメータは Table 6 に示した。また Fig. 9A にリファンピシン存在下及び非存在下におけるアルプラゾラム連続経口投与時の血中濃度シミュレーション結果を示した。両薬剤は 24 時間ごとの投与である。リファンピシン非存在下においては投与ごとに血中濃度が上昇し定常状態に達したのに対し、リファンピシン存在下では時間経過とともに血中濃度は減少し、低いレベルで定常状態に達した。Fig. 9B は投与開始後 4 日目におけるシミュレーション結果と臨床データを示したものであり、リファンピシン併用による DDI を精度よく予測することに成功した (SDEP: 0.760)。その他の基質に関してもリファンピシン投与後初期における時間・濃度曲線が得られたものに関して同様のシミュレーションを行った (Fig. 10)。

Table 6. Pharmacokinetic parameters of CYP3A4 substrates

	$K_{p,h}^a$	$F_a F_g^a$	Clr^a (L/h)	f_{up}^a	R_b^a	k_a^b (h^{-1})	V_1^b (L)	k_{12}^b (h^{-1})	k_{21}^b (h^{-1})	$CL_{int,h}^b$ (L/h)	fm_{CYP3A4}^c
alprazolam	2.29	0.901	0.575	0.29	0.81 ^d	5.77	76.8			12.8	0.75
atorvastatin	0.73	0.141	0.298	0.02	1	1.5	41.8	3.27	0.448	4500	0.68
midazolam	6.59	0.615	0.00801	0.05	0.675	0.739	64.1			1210	0.92
nifedipine	0.75	0.823	0.0309	0.044	0.848	1.12	42.2			1810	0.78
simvastatin	6.91	0.077	0	0.06	1	0.723	88.4			3230	1
triazolam	7.26	0.518	0.263	0.099	1	0.662	36.7			181	0.93
zolpidem	5.84	0.886	0.183	0.08	0.66	0.58	7.48	2.17	1.08	199	0.4
zopiclone	0.99 ^e	0.912 ^f	0.562 ^f	0.45 ^f	0.89 ^d	0.271	40.1			46	0.44

a) The values were obtained from the article of Kato, et al. (Ref.55) unless described otherwise.

b) The values were estimated by curve-fitting to the blood concentration profile, according to the method described in Ref. 55

c) The values were obtained from the article of Ohno, et a. (Ref. 95).

d) The values were obtained from the article of Jantos, et al. (Arch Kriminol 227: 188–203, 2011).

e) The value was derived from the computed octanol/water partition coefficient (logKow: 1.54) of zopiclone, according to the method described in Ref. 55.

f) The values were obtained from the article of Fernandez, et al. (Clin Pharmacokinet 29: 431–441, 1995).

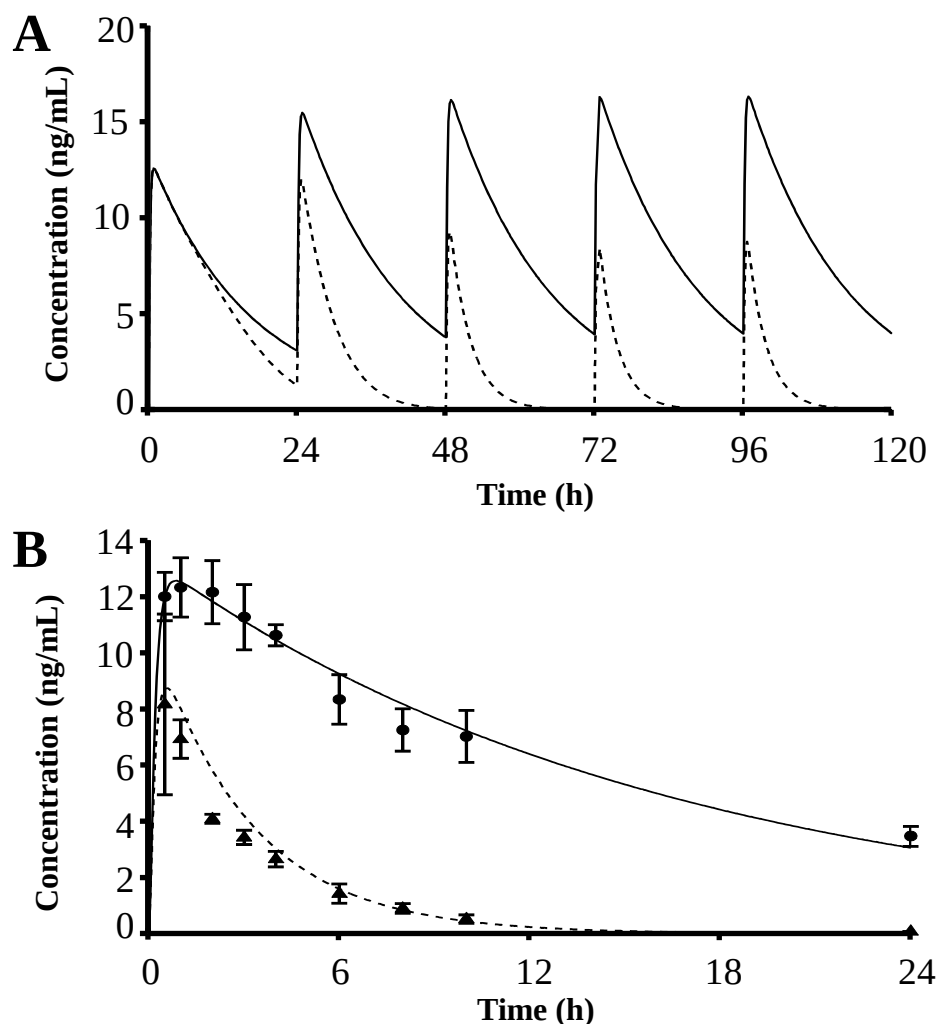


Fig. 9 Simulation of DDI between alprazolam and rifampicin

Fig. 9A represents blood concentration profiles of repeated oral doses of alprazolam in the absence (solid line) and presence (broken line) of rifampicin. Fig. 9B represents the comparison between the predicted blood concentration of alprazolam with the corresponding clinical data (Ref. 5). Keys: 1 mg alprazolam alone (N, solid line); 1 mg alprazolam with 4-day pretreatment with daily doses of 450 mg rifampicin (m, broken line). The pharmacokinetic parameters for alprazolam were estimated by curvefitting to the blood concentrations following the sole administration (standard deviation of residuals, RSD: 0.483), and then used for predicting those following the concomitant administration (standard deviation of prediction errors, SDEP: 0.760). Both RSD and SDEP was the same in terms of formula: $RSD \text{ or } SDEP = \sqrt{\sum (experimental - calculated)^2 / n}$

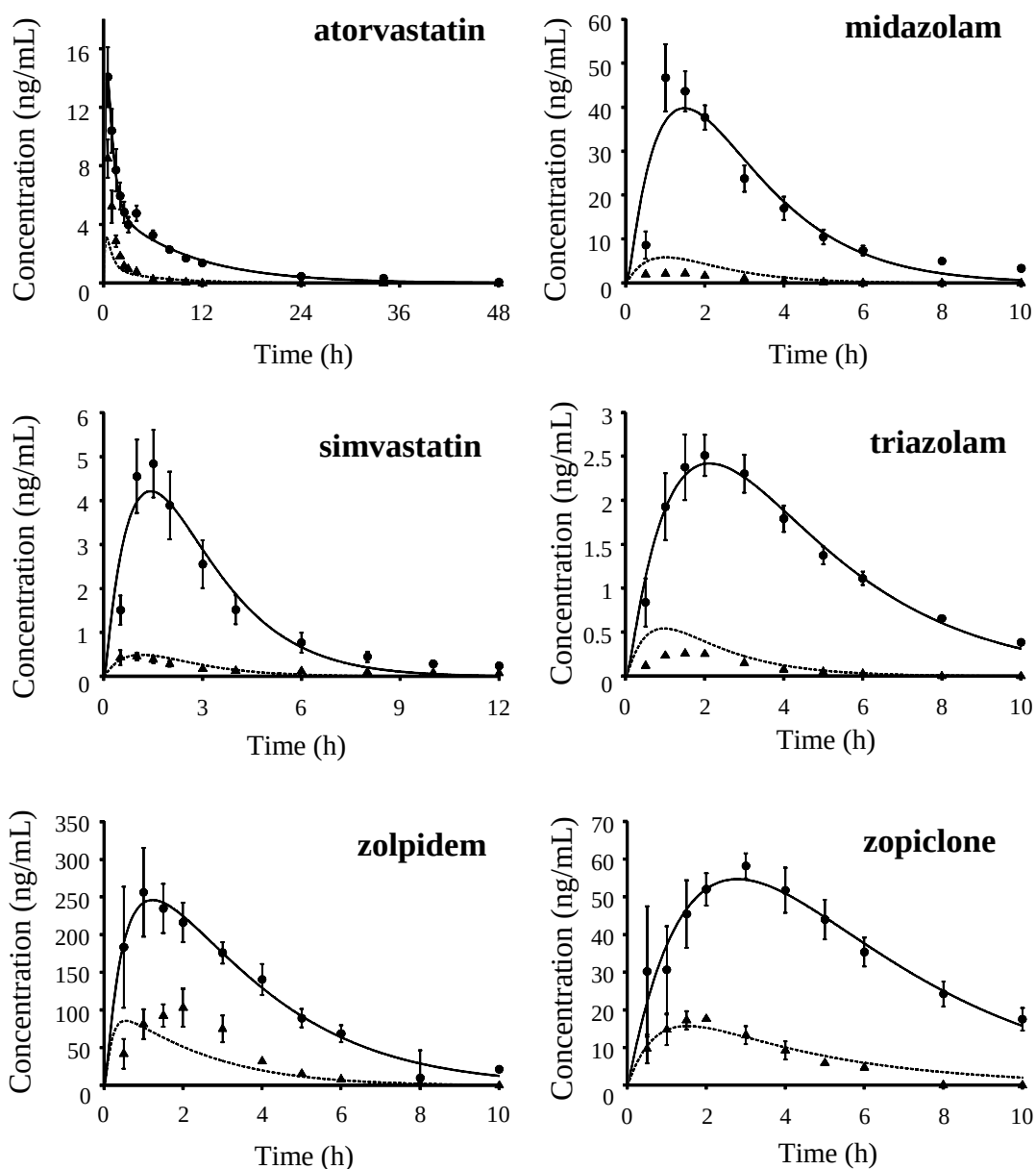


Fig. 10 Simulation of blood concentration of CYP3A4 substrate drugs following their oral administration

Keys: sole administration (●, solid line); 5-day pretreatment with daily doses with 600 mg rifampicin (▲, dash line). Pharmacokinetic parameters for each drug were estimated by curve-fitting to the blood concentrations following the sole administration, and then used for predicting those following co-administration with rifampicin. The pharmacokinetic parameters are given in Table 6.

1-g リファンピシン併用による AUC 変動の予測

Fig. 8 に示される CYP3A4 活性の動的シミュレーションの結果、リファンピシン連続投与による CYP3A4 活性の日内変動はリファンピシン濃度とは異なって緩徐であるため、酵素誘導が定常状態に達する 5 日目以降では、静的モデルで十分 DDI の予測が可能と考えられる。主に肝臓において代謝される薬物の場合、酵素誘導による経口投与後に起こる DDI は以下の式で表される。

$$\frac{AUC^{ind}}{AUC} = \frac{1}{fm_{CYP3A4} \cdot IR + (1 - fm_{CYP3A4})} \quad (20)$$

ここで、AUC と AUC^{ind} は誘導剤の非存在下及び存在下における血中濃度-時間曲線下面積を表す。 fm_{CYP3A4} と IR は基質の代謝に対する CYP3A4 の寄与率及び誘導剤による CYP3A4 活性の誘導率である。この式では基質は主に肝臓において消失され、さらに小腸での酵素誘導は無視できると仮定した。

Table 7 は、種々 CYP3A4 基質とリファンピシンを併用した際の臨床 DDI 試験をまとめたものである。IR 値はリファンピシンの投与量、投与間隔、投与日数を考慮し、試験日の CYP の平均値として推定した。IR 値と各基質の fm_{CYP3A4} 値を用いて、リファンピシン併用による各基質薬物の AUC 減少率を計算した (Fig. 11)。予測の相関係数 (Q^2) 及び予測誤差の標準偏差 (SDEP) は 0.684 と 0.0630 であり、CYP3A4 誘導に関する in vitro パラメータから様々な薬物の AUC 減少をうまく予測できることが示された。

また、従来の手法と比較するために、間接効果モデルによる予測も行った。Simcyp ($0.0072h^{-1}$) 及び in vitro-in vivo 補外によって求められた k_{deg} 値 ($0.03h^{-1}$)^{70,71} を用いた際の Q^2 値はそれぞれ 0.499、0.570 となった。さらに、リファンピシン平均濃度を用いた単純な静的モデルによる予測での Q^2 値は 0.604 であった。

Table 7. Prediction of DDIs for various CYP3A4 substrate drugs with concomitantly administered rifampicin

Substrate		clinical DDI ^{b)}				predicted DDI ^{c)}	
name	fm _{CYP3A4} ^{a)}	daily dose of rifampicin (mg)	days	AUC ratio	Ref. ID	induction ratio (IR) of CYP3A4 activity	AUC ratio
alprazolam	0.75	450	4	0.12	5	9.25 (6.51—19.0)	0.14
atorvastatin	0.68	600	5	0.20	4	9.64 (6.81—19.7)	0.15
buspirone	0.99	600	5	0.088	99	9.64 (6.81—19.7)	0.10
cyclosporine	0.80	600	11	0.27	6	8.16 (5.81—16.5)	0.15
gefitinib	0.39	600	16	0.17	102	7.68 (5.48—15.5)	0.28
imatinib	0.28	600	11	0.26	98	8.16 (5.81—16.5)	0.33
mefloquine	0.44	600	7	0.32	107	8.63 (6.14—17.5)	0.23
midazolam	0.92	600	5	0.041	109	9.64 (6.81—19.7)	0.11
midazolam	0.92	600	9	0.12	97	8.36 (5.94—16.9)	0.13
nifedipine	0.78	600	7	0.082	106	8.63 (6.14—17.5)	0.14
prednisolone	0.18	480	30	0.49	101	6.55 (4.71—13.1)	0.50
simvastatin	1.00	600	9	0.090	97	8.36 (5.94—16.9)	0.12
simvastatin	1.00	600	5	0.14	100	9.64 (6.81—19.7)	0.10
telithromycin	0.49	600	7	0.14	108	8.63 (6.14—17.5)	0.21
triazolam	0.93	600	5	0.051	105	9.64 (6.81—19.7)	0.11
zolpidem	0.40	600	5	0.28	104	9.64 (6.81—19.7)	0.22
zopiclone	0.44	600	5	0.18	103	9.64 (6.81—19.7)	0.21

a) Fraction of the drug metabolized by CYP3A4 (fmCYP3A4) and clinical DDI data were taken from the article of Ohno et al. .

b) Clinical data were obtained from the articles shown with the reference ID (Ref. ID).

c) Induction ratio (IR) of CYP3A4 activity was calculated from daily dose and days of administration of rifampicin by using Eqs. 6–8 and 15–17. The values for IR were represented as an average and upper and lower limits when one S.D. for inter-individual variability of CYP3A4 baseline activity was considered.

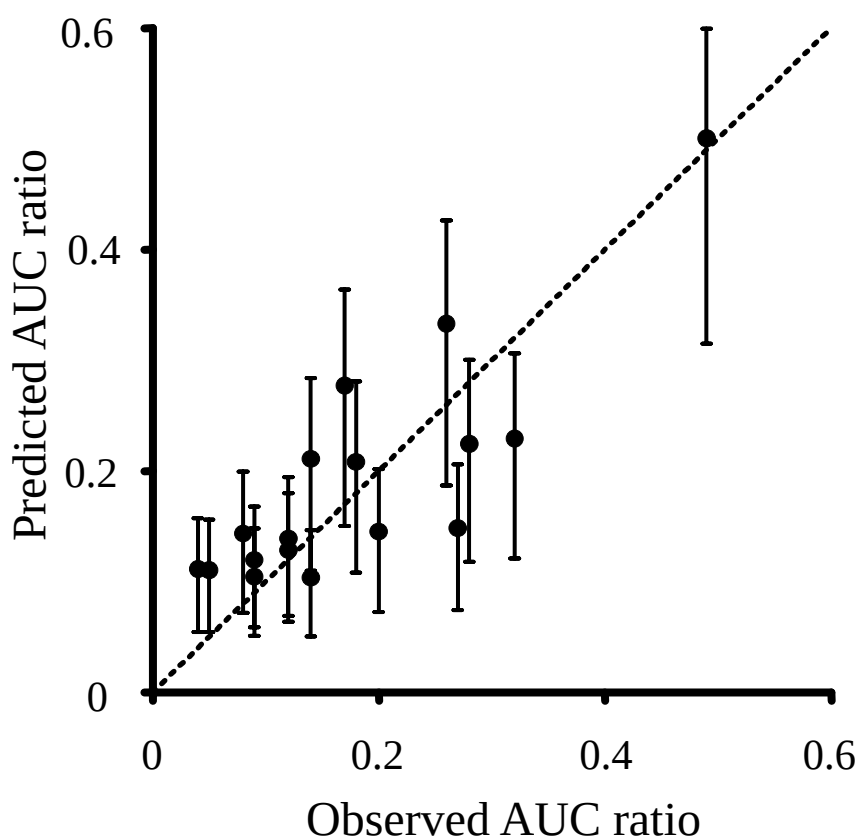


Fig. 11 Correlation between predicted and observed AUC values for various drugs co-administered with rifampicin

This figure was produced using the values listed in Table 7. Error bars for predicted values represent the standard deviation from the interindividual variability in baseline CYP3A4 activity. Not that this variability was estimated using extended least squares analysis of in vitro data.

1-h 考察

本節においては in vitro 実験データを用いて転写・翻訳過程を考慮したより詳細な動的 CYP3A4 誘導モデルを構築し、各種 PBPK モデルと連結することでリファンピシン併用による臨床 DDI の動的な予測を行った。

リファンピシンは PXR の強力なアゴニストであり、CYP3A4 を誘導する。リファンピシンによる PXR 転写活性化は複雑に制御されている。活性化された PXR は、farnesoid X receptor (FXR) のリガンドによって誘導され、PXR/RXR 複合体が DNA に結合するのを阻害する small heterodimer partner (SHP) によって負の制御を受ける⁷⁴。しかしながら、リファンピシンによって誘導された PXR は、SHP 遺伝子の発現を抑制する作用を有し、一方

で HNF4 α 、SRC-1、及び PGC-1 α と相互作用して CYP3A4 遺伝子の転写を誘導する⁷⁵。Fig. 8 に示されるように、リファンピシン投与後の CYP3A4 mRNA 発現量は約 48 時間後に最大となり以降減少したが、これはこうした制御ネットワークを介した遺伝子転写・翻訳のネガティブフィードバックによるものと仮定した。

リファンピシンを連続投与すると、代謝酵素の自己誘導により、リファンピシンクリアランスが増加することが知られている⁷⁶。近年になってリファンピシン代謝に関わる酵素が同定されたが^{77,78}、PXR がその酵素の調節に関わるかは現時点で不明である⁷⁹⁻⁸¹。そのため、リファンピシン動態を記述する PBPK モデルの構築にあたっては、単純な自己誘導のみを考慮した。今回、連続経口投与時のリファンピシン血中濃度推移から 7 つのパラメータを同時に推定したが、各投与計画に対する同時当てはめ計算からパラメータを頑健に決定できた。肝臓組織中における分布のデータが無いにもかかわらず、 $K_{p,h}$ 値の推定を行ったが、求められた $K_{p,h}$ 値は 10.6 であり、ヒト生検によって得られた値(4.8-30.3)の範囲に収まった⁸²。また、Poulin と Theil らによる $K_{p,h}$ の推定アルゴリズム⁸³に基づき、EPI suite によるオクタノール/水分配係数(log K_{ow} : 4.24 EPI Suite, <http://www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuite.htm>)から $K_{p,h}$ を計算したところ、その値は 6.01 となった。これらの事実を照らして、今回当てはめ計算で推定されたリファンピシンの $K_{p,h}$ 値は妥当なものと考えられる。

リファンピシンの *in vitro* 誘導パラメータを求めるに際して、実験中のリファンピシンの分解は無視できるものと仮定した。リファンピシンの代謝を文献値⁸⁰に基づいて *in vitro* CYP3A4 誘導モデルに組み込んでも推定パラメータの差は 16%程度であり、この仮定は問題ないものと考えた。本解析での特筆すべき点として、CYP3A4 活性の定常状態が実験的に捉えられていないにもかかわらず、 $k_{cyp,deg}$ 値が直接パラメータ推定できたことが挙げられる。これは、リファンピシンを除くとベースラインに戻るという仮定によって、mRNA 発現と活性の経時プロファイルの初期の傾きの違いから決定できるようになったためである。推定された $k_{cyp,deg}$ 値($0.0282h^{-1}$)は Simcyp simulator の初期設定値である $0.0072h^{-1}$ よりも、*in vitro-in vivo* 補外研究によって修正された $k_{cyp,deg}$ 値($0.03h^{-1}$)^{70,71}に近い値となった。CYP3A4 の分解半減期は $0.005-0.07h^{-1}$ と報告されており⁸⁴、非常にばらつきが多く、最適な k_{deg} 値を求めるにはより多くの情報が必要であるが、本解析では *in vitro* データから合理的な値を推定できたものと思われる。実際に得られたパラメータを用いて臨床 DDI 試験の結果をシミュレーションしたところ、非定常状態での血中濃度も含めてうまく再現することに成功した (Fig. 9、Fig. 11)。さらに、その予測相関係数は、従来用いられてきた間接効果モデルと比べても高いものであった。

リファンピシンが他の CYP 分子種の誘導にも関わることは FDA ガイダンスにも記載されている²。リファンピシンを併用すると、CYP2B6 基質であるブプロピオンや、CYP2C8 基質であるレパグリニド、CYP2C9 基質であるワルファリンのクリアランスはそれぞれ、2.1~3.4⁸⁵、2.3⁸⁶、2.3~3.8 倍^{87,88}に増加することが報告されている。これらと比べると CYP3A4 に対する典型的な基質のクリアランス増加率は 10 倍程度と非常に大きかった (Table 7)。また、リファンピシン併用による DDI に関する総説が纏められており、リファ

ンピシンは他の CYP や UDP グルクロノシルトランスフェラーゼ、P-gp と比べて CYP3A4 をより効果的に誘導すると記している⁸⁹。これらをふまえると、 fm_{CYP3A4} 値が小さい基質においても CYP3A4 以外の酵素誘導による影響は非常に小さいと考えられる。ゲフィチニブ(fm_{CYP3A4} : 0.39)は CYP2D6 によって大きく代謝されるが⁹⁰、CYP2D6 のリファンピシンによる誘導はほとんど起こらない。一方で、イマチニブ(fm_{CYP3A4} : 0.28)は CYP2C8 によって CYP3A4 と同程度の代謝を受けるため⁹¹、結果としてリファンピシン併用による DDI を過小評価している。プレドニゾロン(fm_{CYP3A4} : 0.18)は CYP3A4 や UGT 以外の CYP によっては代謝されないと報告されている⁹²。プレドニゾロンの fm_{CYP3A4} 値が小さい (fm_{CYP3A4} : 0.18)理由はまだ明らかではないが、リファンピシン併用による DDI を精度よく予測できた。これらの内容を総合して考えると、CYP3A4 基質とリファンピシンの DDI においては、他の酵素やトランスポーターはあまり重要ではないと考えられる。

以上、本節ではヒト肝細胞を用いた *in vitro* 誘導実験データを用いて CYP3A4 誘導に関する PXR 活性化及びそれに伴う転写・翻訳過程を考慮したより詳細な動的誘導モデルを構築した。本モデルとリファンピシン及び基質の PBPK モデルを組み合わせることによって、CYP3A4 誘導による DDI を動的推移も含めてシミュレーションすることに成功した。

第二節 生体機能モデリング・シミュレーション環境を用いた薬物間相互作用モデルの実装

近年、システム薬理学という分野が注目されている⁹³⁻⁹⁵。この分野は生体機能を担う構成要素の同定と要素の相互作用を研究するシステムズバイオロジーの方法論を、薬理学に取り入れたものである。システムレベルでは、生体分子が多対多で相互作用する動的なネットワークを形成していると考えられ、薬物による生体反応を理解するには、標的分子のみならず関連する生体機能ネットワーク全体を統合的に理解することが必要である。

このような生体のモデル化を行うためにはそれをサポートする様々なツールが必要である。システムバイオロジー分野の進歩の中で、モデルと詳細なデータを記述するための言語や、実装を行うためのグラフィカルな環境、シミュレーションを実行するツールが開発・整備されてきた⁹⁶。さらに、データベースも公開されており、研究者コミュニティの中でモデルが共有・再利用されることで、モデルの高度化や洗練が進んでいる⁹⁶。このように生命現象のモデル化が着実に進む状況下、システム薬理学研究を推進するためには、本研究で構築した薬物体内動態モデルもこうした統合環境の下でモジュール化することが重要である。そこで、本章の第一節で構築した DDI に関するモデルを例にとり、生体機能モデリング・シミュレーション環境での再現を試みた。

2-a SBML 及び PHML によるモデルの実装

薬物動態は生体の階層構造に依存する現象であり、様々な物理方程式をモジュール化して統合できる Physiological Hierarchy Markup Language (PHML) 言語の利用が有効と考え、PhysioDesigner を用いてモデルの実装を行った。一方、酵素誘導は細胞内での分子ネットワークで起こる生化学的な反応であり、動的酵素誘導モデルの実装は CellDesigner を用い Systems Biology Markup Language (SBML) 言語でコード化した (Fig. 12 A, B)。

Fig. 12A にあるように、PBPK モデルは大きく小腸管腔と全身とからなる二つのモジュールで定義した。これらのモジュール間では小腸からの薬物吸収速度のみが渡される。このようにモジュールをカプセル化することにより、モデルの保全性と拡張性を高めることが可能である。また、各モジュールでは内部に必要なモジュールを階層的に定義した。今回のリファンピシンのモデルでは薬物は連続経口投与されるが、テンプレート・インスタンスフレームワークを用いることによってモデル実装の負担を軽減し、吸収速度は各インスタンスからの和として算出した。一方、全身モジュールには肝臓と血液のモジュールに共通する静的変数を内包した。濃度計算のための微分方程式は肝臓と血液のモジュール内に実装した。

2-b PhysioDesigner による連成シミュレーション

構築した各モデルをそれぞれモジュールとして PhysioDesigner 上にインポートし、連成した (Fig. 12C)。各 PBPK モデルはカプセル化された CYP3A4 誘導モデルを挟んで連結した。CYP3A4 誘導モデルには肝臓における非結合型誘導剤濃度の値を誘導剤の PBPK モデルより渡し、さらに推定された IR 値を基質の PBPK モデルに渡した。この CYP3A4 誘導モジュールは単にフレームだけを示しており、その内部には SBML で記述した動的 CYP3A4 誘導モデルをインポートすることで全体のモデルを完成させた。Fig. 13 に本モデルを用いて、第一節のアルプラゾラムとリファンピシン併用時の DDI を例として、Flint によって行ったシミュレーションの結果を示しているが、アルプラゾラムを連続経口投与しているにもかかわらず、血中濃度の増大は起こらず、むしろ酵素誘導によりクリアランスが増大し、血中濃度は下げ止まる形で定常状態に到達することが理解される。Fig. 9 はこのシミュレーションを示したもので、本統合シミュレーション環境下でも忠実に DDI 現象を再現できた。

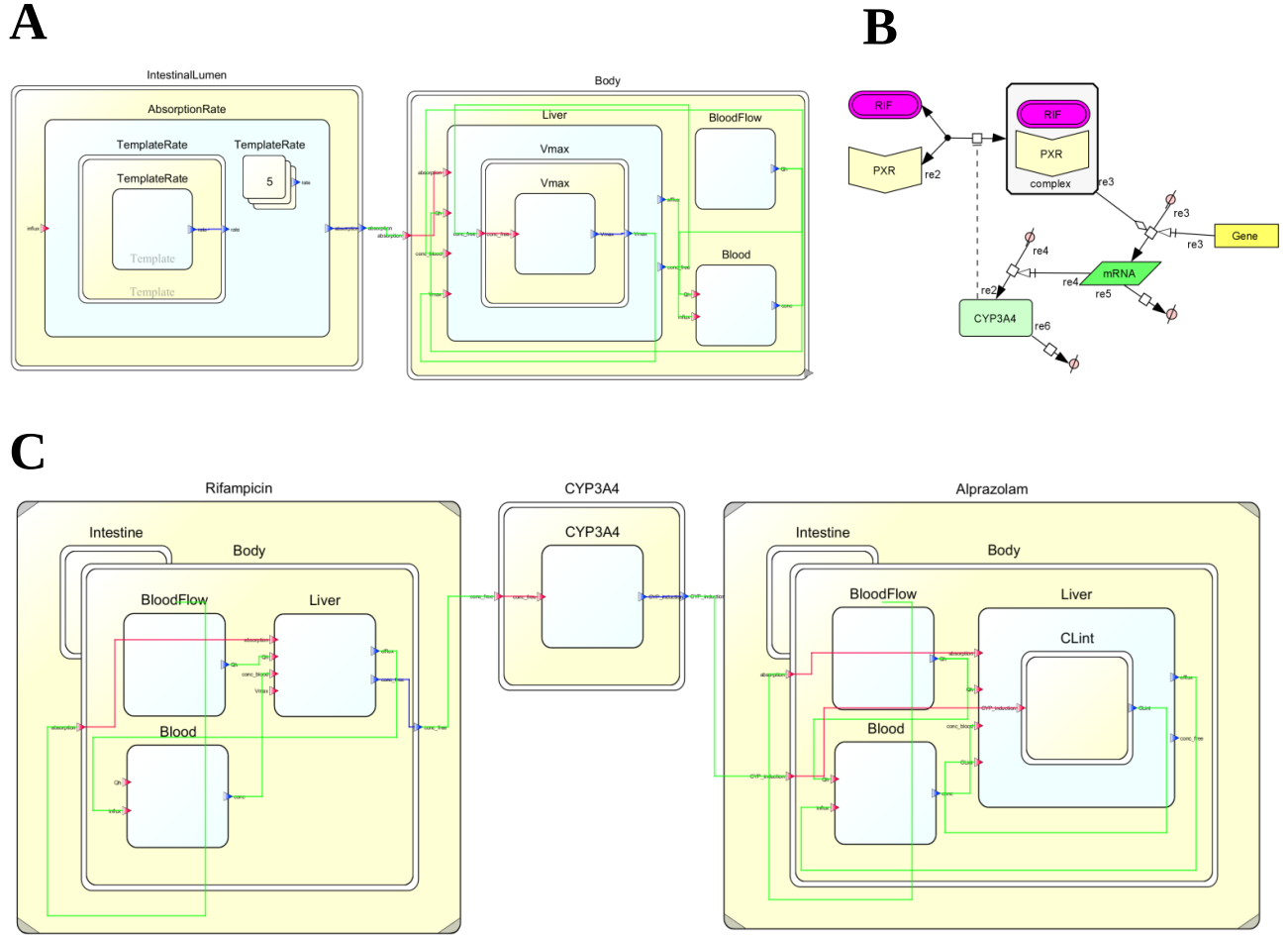


Fig. 12 Snapshots of DDI models implemented in multi-hierarchical physiology simulation platforms

Fig. 12A represents a PBPK model for rifampicin implemented on PhysioDesigner, and Fig. 12B represents a transcription/translation dynamics model for CYP3A4 following administration of the drug, as implemented on CellDesigner. Fig. 12C represents a PBPK-based DDI model, where the enzyme induction model was hybridized. Yellow and white rectangles represent the capsule module and functional module, respectively. Modules can communicate by connecting their ports with an edge.

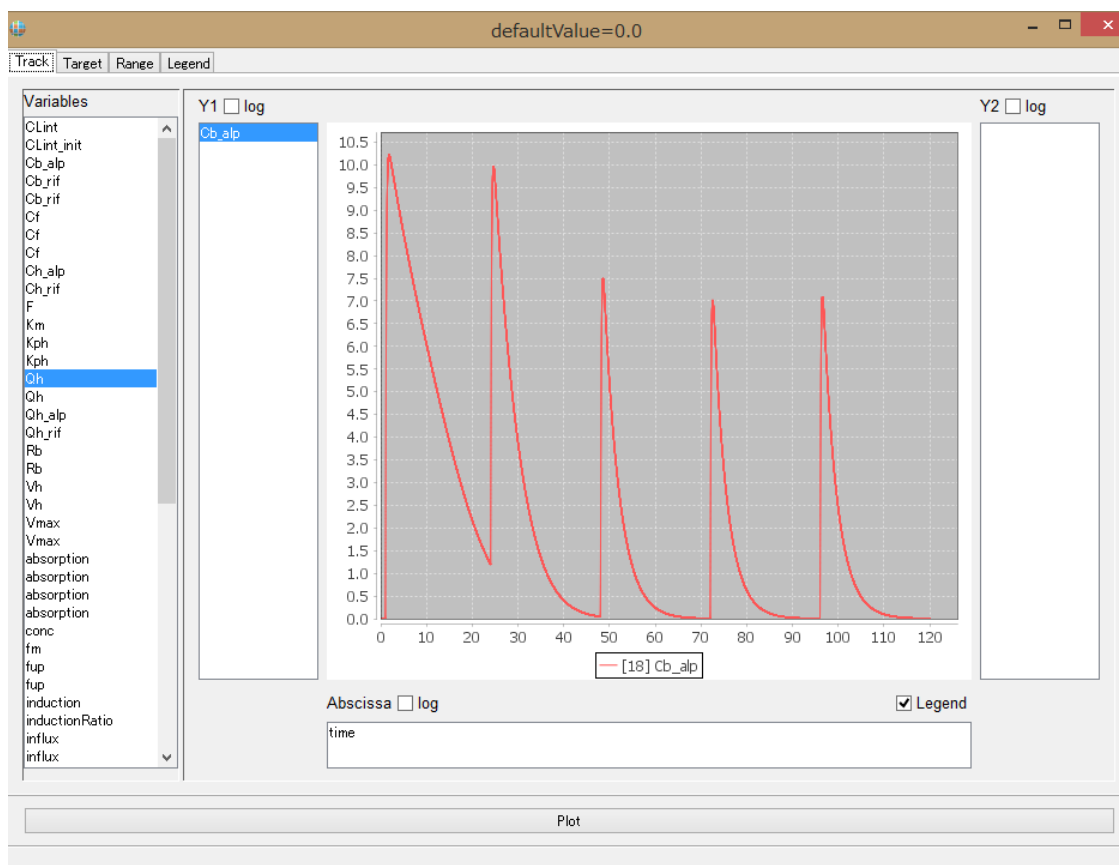


Fig. 13 Flint simulation of DDI between alprazolam and rifampicin

PHML/SBML hybrid DDI model was implemented in PhysioDesigner. Then, 5 days repeated dose of alprazolam and rifampicin was simulated by using Flint simulator.

2-c 考察

本節においては生体機能モデリング・シミュレーション環境を用いた DDI モデルの実装、シミュレーションを行った。

PHML は insilicoML (ISML)⁹⁷ を継承しており、階層的な構造を持つモデルを様々な生物学的、生理学的機能を記述するための、新しい XML に基づく言語である。常微分方程式、偏微分方程式からなる数式モデルや、エージェントベースモデルなどを記述することも可能である。ISML と同様に、モデルは機能モジュールの集まりによって表現されており、それぞれのモジュールは数式によって特徴づけられる。PhysioDesigner は PHML や ISML で記述されたモデルをグラフィカルに編集、閲覧できるツールである。PhysioDesigner の大きな特徴として SBML と PHML を連結したモデルの実装が可能である。SBML は生物化学反応ネットワークモデルを表現するために広く用いられている標準的な言語であり、これを用いることで多階層的な生理学的モデルを構築することが可能となる。

本研究においては PhysioDesigner の PHML-SBML 連成シミュレーション機能を用いることで、動的に PBPK モデルと転写・翻訳過程を考慮した動的酵素誘導モデルを連結し、DDI を再現した。このようにモデルをモジュールとして記述することにより、再利用性が向上し、将来的により複雑なネットワークに拡張することが期待される。

結論

以上、著者は二章にわたり、CYP3A4 等の酵素の誘導に関わる核内受容体である PXR のリガンドに起因する DDI の *in silico* 予測に関して、まず PXR リガンドに対する構造活性相関解析を行い、次に代表的な PXR リガンドであるリファンピシンによる臨床 DDI の *in vitro-in vivo* 補外予測を行い以下の知見を得た。

第一章 再帰分割法を利用した Pregnane X 受容体活性化予測ディシジョンツリーの構築

自然言語処理を利用して、PXR と化合物との相互作用に関する情報をテキストマイニングするシステムを開発した。これにより、ヒト PXR アゴニスト 67 個、非アゴニスト 15 個を PubMed データベースから抽出することに成功した。また、本システムは動詞リストの修正により P-glycoprotein の相互作用薬に関する情報も収集でき、異なる機能タンパク質に適用可能であることを確認した。さらに、上記情報に PubChem BioAssay データベースのスクリーニングデータ及び文献中のデータを加えることで大きなデータセットを構築し、再帰分割法による構造活性相関モデルの構築を行った。構造活性相関解析の結果得られた決定木モデルからは、内部予測率が 79.0%、外部予測率が 70.9%と十分な精度の予測が可能であり、さらにモデルの構造から PXR との相互作用には疎水性相互作用、特に π - π 相互作用が重要であることが示唆された。

第二章 リファンピシン併用による CYP3A4 誘導を起因とする臨床薬物間相互作用予測モデルの構築

PXR の代表的なリガンドであるリファンピシン併用による CYP3A4 誘導を起因とする DDI を精度よく予測するために、ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 誘導実験データを基に転写・翻訳過程を考慮した詳細な誘導動的モデルを構築した。本モデルと誘導剤及び基質薬物の PBPK モデルを組み合わせることで臨床 DDI モデルを構築し、リファンピシンの併用による各種 CYP3A4 基質薬物の血中濃度低下を動的推移を含めて、十分な精度で予測することができた。また、各種 PBPK モデルを PHML で、誘導動的モデルを SBML で記述したものを汎用生体モデリング・シミュレーション環境である PhysioDesigner にモジュールとしてインポートし連成実装することで忠実に DDI のシミュレーションを再現できることを確認した。

以上、著者は PXR リガンドの構造活性相関およびその代表であるリファンピシンによって引き起こされる DDI の *in vitro-in vivo* 補外予測を行った。本研究は、薬物代謝酵素誘導

に起因する DDI の *in silico* モデルの開発指針を示すとともに、生理学的速度論を基盤としたシステム薬理学分野でのシミュレーター開発の先駆けとして有益な知見を提供するものと期待される。

謝辞

終わりに臨み、本研究の実施にあたり終始懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 橋田 充教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、終始懇篤なる御助言、御指導を賜りました京都大学大学院薬学研究科 山下 富義准教授に謹んで深く感謝の意を表します。

併せて、トランスポーター情報のテキストマイニングについて貴重な御助言を賜りました理化学研究所 杉山 雄一特別招聘研究員、及び東京大学大学院薬学系研究科 前田和哉講師に深く感謝の意を表します。

薬物間相互作用解析に関する有意義な御助言を賜りました東京大学医学部附属病院 薬剤部 鈴木 洋史教授、及び千葉大学大学院薬学研究院 樋坂 章博教授に深く感謝の意を表します。

生体機能モデリング・シミュレーション環境の利用に関して、懇切なるご協力、御助言を賜りました沖縄科学技術大学院大学 北野 宏明教授、及び浅井 義之博士に深く感謝の意を表します。

さらに、様々な有益な御指摘、御助言を賜りました京都大学学際融合教育研究推進センター 樋口 ゆり子特定講師、京都大学物質・細胞統合システム拠点 橋田 泰彦博士、並びに京都大学大学院薬学研究科 薬品動態制御学分野教室員一同に深謝致します。

最後に、研究に専念できる環境を与えてくださった父 直久、母 玲子に深く感謝致します。

実験の部

第一章 第一節 実験の部

[1] 化合物-PXR 間相互作用に対するテキストマイニング

化合物-PXR 間相互作用に関する情報の抽出は主に 3 個のステップからなる。まず、文章中の化合物名と PXR 名の識別を行い、次に、化合物名と PXR 名を含む全ての文を、一つの事象のみを含む単純な文に変換する。そして、この単純な文から化合物-PXR 間相互作用をパターンマッチングによって抽出する。まず、Mesh (US National Library of Medicine) より化合物及びタンパク質名を抽出し、約 100,000 個のエントリーから成る化合物辞書を構築した。この他に PXR 名と同義語からなる辞書を構築した。化合物名の識別においては、単純な辞書ベースでのアプローチのみでは辞書にない多くの化合物が漏れたり、部分一致による誤抽出することが起こるため、パターンマッチングルールのセットから成る文脈ベースによるアプローチを組み合わせた。このために化合物に関わる単語(例えば、concentration, effect, mg/mL など)などを含む特異的な用語のリストを別途作成した。化合物名辞書を動的に作成するために、まず文章全体をパターンマッチングで解析し、化合物名の最初の識別を行った。そして再度化合物名と PXR 名の識別を行い、化合物名及び PXR 名の両方が含まれる文に対して構文解析を行った。それぞれの文を品詞のタグ付けを基に名詞句、動詞句に分類し、最終的には PXR 名、化合物名、相互作用を表す動詞からなる単純な文に再構築した。

既報のテキストマイニングシステムに対する最も大きな変更点は、動詞リストの PXR 活性解析に合わせた再構築である。パターンマッチングはこの単純な文中の 3 つのキーワード(化合物名、PXR 名、動詞)の順序を基に、前置詞、接続詞を考慮して行った。化合物名と PXR 名が文中の同じ句にあるかどうか、それぞれの場合に対し様々なパターンを構築した。さらに、否定を表す単語(例えば not, no, n't, unable や unlikely)などの存在も否定的な文であるかを確認するために識別した。本システム全体は自然言語処理ソフトウェアである general architecture for the text engineering (GATE)に実装することで実行した。単語の切り分けや品詞のタグ付け、形態素解析は GATE に備わっているシステムを利用した。

[2] テキストマイニングシステムの評価

再現率(R)及び適合率(P)は以下の式によって求めた。

$$R = \frac{TP}{TP + FN} \quad P = \frac{TP}{TP + FP}$$

ここで TP、FN、FP はそれぞれ真陽性、偽陰性、偽陽性である。

第一章 第二節 実験の部

[1] PubChem BioAssay からの情報入手

PubChem BioAssay データベースからの PXR 活性に関するスクリーニングデータを手した。このうち用いたものは AID381941、404232、463086 であり、AID434939 は除外した。AID434939 は最も多くの化合物を対象としたアッセイであるが、その確認実験である AID463086 のアッセイで偽陽性データが多く含まれているためである。PXR 活性の基準には、過去の文献¹⁵を参照し、ED50 値が 100 μ M 以下のものを PXR アゴニストとした。

[2] 主成分分析

得られた化合物の分子記述子は ADMET Predictor ver. 5.0 (Simulation Plus, Inc., Lancaster, CA)を用いて計算した。分子記述子には、構造記述子やトポロジカル記述子、脂溶性、水素結合、イオン化に関する記述子などが含まれる。これらの内、全ての化合物において値が 0 のもの、また極端に偏っているもの(歪度が 5 より大きいもの)は解析上不要として削除し、残りの分子記述子を用いて主成分分析を行った。ソフトウェアには MATLAB7.9.0 (MathWorks, INC., Natick, MA)を用い、全記述子を正規化後に princomp 関数で解析した。

[3] 再帰分割法による構造活性相関解析

解析にあたってまず、データセットをモデル構築に用いる訓練セットと、評価に用いるテストセットにランダムに分けた(訓練:テスト=4:1)。再帰分割法は訓練データの分子記述子を用いて MATLAB で行った。Treefit 関数により大きな決定木を構築し、その後 treetest(“crossvalidate”)関数によって交叉検証を行うことで剪定最適化を行った。最終的なモデルは treeprune 関数によって得た。決定木モデルの分類能の評価は検証用データを用いて行った。

第二章 第一節 実験の部

[1] 解析用データセットの構築

15 個の CYP3A4 基質薬物について、経口クリアランスに対する CYP3A4 代謝寄与率 fm_{CYP3A4} を文献より収集した^{98,99}。これらの値は 53 の臨床 DDI 試験において CYP3A4 阻害剤による試験薬物の経口投与時の血中濃度-時間曲線下面積 (AUC_{oral}) の上昇から推定したものである。リファンピシンと CYP3A4 基質薬物併用時における動態情報も、文献より収集した^{6-8,100-112}。また、初代培養ヒト肝細胞を用いてリファンピシンによる CYP3A4 mRNA 及び酵素活性誘導を測定した実験データも文献より収集した^{64,113-117}。

[2] 動的 CYP 誘導モデルの構築

本論文中式(6)~(8)のパラメータを、ヒト肝細胞にリファンピシンを投与した *in vitro* 実験データに対する当てはめ計算によって求めた。ヒト肝細胞の代謝能のロット間変動は定常状態における CYP3A4 活性で説明できるため⁶⁷、CYP₀に個体間変動を考慮した拡張最小二乗法による推定を行った。解析は NONMEM7.2 の ADVAN9 を用いて行った。

[3] 間接効果モデルの構築

本論文中の式(13)のパラメータを、ヒト肝細胞にリファンピシンを投与した *in vitro* 実験データに対する当てはめ計算によって求めた。 E_{max} に個体間変動を考慮し、NONMEM7.2 の ADVAN9 を用いて拡張最小二乗法による解析を行った。

[4] 静的モデルの構築

本論文中の式(14)のパラメータを、リファンピシン投与 72 時間後の *in vitro* 実験データを用いて推定した。 E_{max} に個体間変動を考慮し、NONMEM7.2 の ADVAN9 を用いて拡張最小二乗法による解析を行った。

[5] リファンピシン PBPK モデルの構築

PBPK モデルの構築には、各組織における薬物血中濃度の測定が必要である。しかしながら、臨床では血液と尿中における濃度のみしか得られないので、血液と肝臓における循環のみを考慮した抽象モデルが利用されることが多い⁵⁷。そこで、これを参考に、リファンピシンの非線形な肝消失と連続投与によって引き起こされる自己誘導⁷³を組み込んだ PBPK モデル(本論文中の式(15)~(17))を構築した。パラメータ推定は、NONMEM7.2 の ADVAN9 を用い、臨床リファンピシン動態データに対する当てはめ計算によって行った。

[6] リファンピシン併用による DDI の動的シミュレーション

本文中の式(15)~(17)を用いてリファンピシン連続経口投与時(600mg q.d)の肝臓における非結合型濃度を求め、これを式(6)または(13)の RIF 値に代入することで、式(6)~(8)、及

び(13)から臨床における CYP3A4 誘導率 (CYP')の時間推移を推定した。また基質の PBPK モデルに対しては、本論文中的式(15)、(18)を用い、各基質の動態データに対する当てはめ計算によってパラメータ推定を行った。解析には NONMEM7.2 の ADVAN9 を用いた。さらに式(19)から、肝固有クリアランスの CYP3A4 誘導の時間推移による変動を考慮することで DDI をシミュレーションした。

第二章 第二節 実験の部

[1] 生体機能モデリング・シミュレーション環境への実装

リファンピシン及びアルプラゾラムの PBPK モデルは PhysioDesigner を用いて PHML で、動的酵素誘導モデルは CellDesigner を用いて SBML で記述した。

[2] PhysioDesigner による DDI のシミュレーション

上記のモジュール化されたモデルを PhysioDesigner 上にインポートし、連成させることで DDI モデルを構築した。シミュレーションは Flint を用いて行った。

引用文献

1. Yu J, Ritchie TK, Mulgaonkar A, Ragueneau-majlessi I. Minireview Drug Disposition and Drug-Drug Interaction Data in 2013 FDA New Drug Applications : A Systematic Review s. *Drug Metab Dispos.* 2014;42:1991-2001.
2. FDA. Guidance for industry. Drug interaction studies study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations. *Guid Doc.* 2012;(February):79.
3. EMA. Guideline on the investigation of drug interactions. *Guid Doc.* 2012.
4. PMDA. 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(最終案).
5. di Masi A, Marinis E De, Ascenzi P, Marino M. Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects. *Mol Aspects Med.* 2009;30(5):297-343.
6. Backman JT, Luurila H, Neuvonen M, Neuvonen PJ. Rifampin markedly decreases and gemfibrozil increases the plasma concentrations of atorvastatin and its metabolites. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;78(2):154-167.
7. Schmider J, Brockmöller J, Arold G, Bauer S, Roots I. Simultaneous assessment of CYP3A4 and CYP1A2 activity in vivo with alprazolam and caffeine. *Pharmacogenetics.* 1999;9:725-734.
8. Hebert MF, Roberts JP, Prueksaritanont T. Bioavailability of cyclosporine with concomitant rifampin administration is markedly less than predicted by hepatic enzyme induction. *Clin Pharmacol Ther.* 1992;52:453-457.
9. DL M, EB S, PE O, SW J, JC B, NE. S. Acute rejection and massive cyclosporine requirements in heart transplant recipients treated with rifampin. *Transplantation.* 1985;39(3):313-314.
10. Urquhart BL, Tirona RG, Kim RB. Nuclear Receptors and the Regulation of Drug-Metabolizing Enzymes and Drug Transporters: Implications for Interindividual Variability in Response to Drugs. *J Clin Pharmacol.* 2007;47(5):566-578.
11. Watkins RE. The Human Nuclear Xenobiotic Receptor PXR: Structural Determinants of Directed Promiscuity. *Science (80-).* 2001;292(5525):2329-2333.
12. Watkins RE, Maglich JM, Moore LB, et al. 2.1 Å crystal structure of human PXR in complex with the St. John's wort compound hyperforin. *Biochemistry.* 2003;42(6):1430-1438.
13. Gao YD, Olson SH, Balkovec JM, et al. Attenuating pregnane X receptor (PXR) activation: a molecular modelling approach. *Xenobiotica.* 2007;37(2):124-138.
14. Kortagere S, Chekmarev D, Welsh WJ, Ekins S. Hybrid scoring and classification approaches to predict human pregnane X receptor activators. *Pharm Res.* 2009;26(4):1001-1011.
15. Khandelwal A, Krasowski MD, Reschly EJ, Sinz MW, Swaan PW, Ekins S. Machine

- Learning Methods and Docking For Predicting human Pregnane X receptor Activation. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(7):1457-1467.
doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate.
16. Ekins S, Kortagere S, Iyer M, et al. Challenges predicting ligand-receptor interactions of promiscuous proteins: the nuclear receptor PXR. *PLoS Comput Biol*. 2009;5(12):e1000594.
 17. Ekins S, Erickson J a. A pharmacophore for human pregnane X receptor ligands. *Drug Metab Dispos*. 2002;30(1):96-99.
 18. Ekins S, Mirny L, Schuetz EG. A ligand-based approach to understanding selectivity of nuclear hormone receptors PXR, CAR, FXR, LXR??, and LXR?? *Pharm Res*. 2002;19(12):1788-1800.
 19. Schuster D, Langer T. The identification of ligand features essential for PXR activation by pharmacophore modeling. *J Chem Inf Model*. 2005;45(2):431-439.
 20. Ung CY, Li H, Yap CW, Chen YZ. In Silico Prediction of Pregnane X Receptor Activators by Machine Learning Approaches. *MolPharmacol*. 2007:158-168.
 21. Sutherland JJ, Weaver DF. Development of quantitative structure-activity relationships and classification models for anticonvulsant activity of hydantoin analogues. *J Chem Inf Comput Sci*. 2003;43(3):1028-1036.
 22. Ekins S, Erickson JA. A pharmacophore for human pregnane X receptor ligands. *Drug Metab Dispos*. 2002;30(1):96-99.
 23. Feng C, Yamashita F, Hashida M. Automated extraction of information from the literature on chemical-CYP3A4 interactions. *J Chem Inf Model*. 2007;47(6):2449-2455.
 24. Yamashita F, Feng C, Yoshida S, Itoh T, Hashida M. Automated Information Extraction and Structure-Activity Relationship Analysis of Cytochrome P450 Substrates. *J Chem Inf Model*. 2011;51(2):378-385.
 25. Ozawa N, Shimizu T, Morita R, et al. Transporter database, TP-Search: a web-accessible comprehensive database for research in pharmacokinetics of drugs. *Pharm Res*. 2004;21(11):2133-2134.
 26. K I, H K, Y S. Effects of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein on oral drug absorption--theoretical approach. *Pharm Res*. 1999;16(2):225-231.
 27. Watkins PB. The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. *Adv Drug Deliv Rev*. 1997;27(2-3):161-170.
 28. Ono T, Hishigaki H, Tanigami a, Takagi T. Automated extraction of information on protein-protein interactions from the biological literature. *Bioinformatics*. 2001;17(2):155-161.
 29. Ding J, Berleant D, Nettleton D, Wurtele E. Mining MEDLINE: abstracts, sentences, or phrases? *Pac Symp Biocomput*. 2002;337:326-337.

30. Horn F, Lau AL, Cohen FE. Automated extraction of mutation data from the literature: application of MuteXt to G protein-coupled receptors and nuclear hormone receptors. *Bioinformatics*. 2004;20(4):557-568.
31. Hu ZZ, Narayanaswamy M, Ravikumar KE, Vijay-Shanker K, Wu CH. Literature mining and database annotation of protein phosphorylation using a rule-based system. *Bioinformatics*. 2005;21(11):2759-2765.
32. Pustejovsky J, Castaño J, Zhang J, Kotecki M, Cochran B. Robust relational parsing over biomedical literature: extracting inhibit relations. *Pacific Symp Biocomput Pacific Symp Biocomput*. 2002;373:362-373.
33. Jiao D, Wild DJ. Extraction of CYP Chemical Interactions from Biomedical Literature Using Natural Language Processing Methods. *J Chem Inf Model*. 2009;49(2):263-269.
34. Yan Y, Kim J, Croset S, Rebholz-schuhmann D. Finding small molecule and protein pairs in scientific literature using a bootstrapping method. 2012;(BioNLP):172-175.
35. Krauthammer M, Nenadic G. Term identification in the biomedical literature. *J Biomed Inform*. 2004;37(6):512-526.
36. Meystre SM, Savova GK, Kipper-Schuler KC, Hurdle JF. Extracting information from textual documents in the electronic health record: a review of recent research. *Yearb Med Inf*. 2008;35:128-144.
37. Zhang Y, Benet LZ. The Gut as a Barrier to Drug Absorption. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(3):159-168.
38. Benet LZ, Wu CY, Hebert MF, Wachter VJ. Intestinal drug metabolism and antitransport processes: A potential paradigm shift in oral drug delivery. *J Control Release*. 1996;39(2-3):139-143.
39. Watanabe T, Maeda K, Nakai C, Sugiyakma Y. Investigation of the effect of the uneven distribution of CYP3A4 and P-glycoprotein in the intestine on the barrier function against xenobiotics: a simulation study. *J Pharm Sci*. 2013;102(9):3204.
40. Wachter VJ, Wu CY, Benet LZ. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol Carcinog*. 1995;13(3):129-134.
41. Luo G, Cunningham M, Kim S, et al. Cyp3a4 Induction By Drugs : Correlation Between a Pregnane X Receptor Reporter Gene Assay and Cyp3a4 Expression in Human Hepatocytes Abstract : *Drug Metab Dispos*. 2002;30(7):795-804.
42. Cui X, Thomas A, Gerlach V, White RE, Morrison R a, Cheng K-C. Application and interpretation of hPXR screening data: Validation of reporter signal requirements for prediction of clinically relevant CYP3A4 inducers. *Biochem Pharmacol*. 2008;76(5):680-689.
43. Giordanetto F, Fossa P, Menozzi G, Mosti L. In silico rationalization of the structural

- and physicochemical requirements for photobiological activity in angelicine derivatives and their heteroanalogues. *J Comput Aided Mol Des.* 2003;17:53-64.
44. Phillips J, Purchase R, Watts P, Gangolli S. An evaluation of the decision tree approach for assessing priorities for safety testing of food additives. *Food Addit Contam.* 1987;4(2):109-123.
 45. Yamashita F, Itoh T, Hara H, Hashida M. Visualization of large-scale aqueous solubility data using a novel hierarchical data visualization technique. *J Chem Inf Model.* 2006;46(3):1054-1059.
 46. Put R, Perrin C, Questier F, Coomans D, Massart DL, Vander Heyden Y. Classification and regression tree analysis for molecular descriptor selection and retention prediction in chromatographic quantitative structure-retention relationship studies. *J Chromatogr A.* 2003;988(2):261-276.
 47. Xia X, Maliski E, Cheetham J, Poppe L. Solubility prediction by recursive partitioning. *Pharm Res.* 2003;20(10):1634-1640.
 48. Bai JP, Utis a, Crippen G, et al. Use of classification regression tree in predicting oral absorption in humans. *J Chem Inf Comput Sci.* 2004;44(6):2061-2069.
 49. Deconinck E, Hancock T, Coomans D, Massart DL, Vander Heyden Y. Classification of drugs in absorption classes using the classification and regression trees (CART) methodology. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;39(1-2):91-103.
 50. Ekins S, Berbaum J, Harrison RK. Generation and validation of rapid computational filters for cyp2d6 and cyp3a4. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(9):1077-1080.
 51. Yamashita F, Hara H, Ito T, Hashida M. Novel Hierarchical Classification and Visualization Method for Multiobjective Optimization of Drug Properties: Application to Structure–Activity Relationship Analysis of Cytochrome P450 Metabolism. *J Chem Inf Model.* 2008;48(2):364-369.
 52. Itoh T, Takakura H, Sawada A, Koyamada K. Hierarchical visualization of network intrusion detection data. *IEEE Comput Graph Appl.* 2006;26(2):40-47.
 53. Xiao L, Nickbarg E, Wang W, et al. Evaluation of in vitro PXR-based assays and in silico modeling approaches for understanding the binding of a structurally diverse set of drugs to PXR. *Biochem Pharmacol.* 2011;81(5):669-679.
 54. Kanamitsu S, Ito K, Sugiyama Y. Quantitative prediction of in vivo drugdrug interactions from in vitro data based on physiological pharmacokinetics: use of maximum unbound concentration of inhibitor at the inlet to the liver. *Pharm Res.* 2000;17(3):336-343.
 55. Galetin A, Burt H, Gibbons L, Houston JB. Prediction of Time-Dependent Cyp3a4 Drug-Drug Interactions : Impact of Enzyme Degradation , Parallel Elimination Pathways , and Intestinal Inhibition Abstract : *Drug Metab Dispos.* 2006;34(1):166-175.

56. Ito K, Brown HS, Houston JB. Database analyses for the prediction of in vivo drug-drug interactions from in vitro data. *Br J Clin Pharmacol*. 2004;57(4):473-486.
57. Kato M, Shitara Y, Sato H, et al. The quantitative prediction of CYP-mediated drug interaction by physiologically based pharmacokinetic modeling. *Pharm Res*. 2008;25(8):1891-1901.
58. Kato M, Chiba K, Horikawa M, Sugiyama Y. The quantitative prediction of in vivo enzyme-induction caused by drug exposure from in vitro information on human hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2005;20(4):236-243.
59. Shou M, Hayashi M, Pan Y, et al. Modeling , Prediction , and in Vitro in Vivo Correlation of CYP3A4 Induction ABSTRACT : *Drug Metab Dispos*. 2008;36(11):2355-2370.
60. Grime K, Ferguson DD, Riley RJ. The use of HepaRG and human hepatocyte data in predicting CYP induction drug-drug interactions via static equation and dynamic mechanistic modelling approaches. *Curr Drug Metab*. 2010;11(10):870-885.
61. Yang J, Liao M, Shou M, et al. Cytochrome p450 turnover: regulation of synthesis and degradation, methods for determining rates, and implications for the prediction of drug interactions. *Curr Drug Metab*. 2008;9(5):384-394.
62. Almond LM, Yang J, Jamei M, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A. Towards a quantitative framework for the prediction of DDIs arising from cytochrome P450 induction. *Curr Drug Metab*. 2009;10(4):420-432.
63. Fahmi O a., Hurst S, Plowchalk D, et al. Comparison of different algorithms for predicting clinical drug-drug interactions, based on the use of CYP3A4 in vitro data: Predictions of compounds as precipitants of interaction. *Drug Metab Dispos*. 2009;37(8):1658-1666.
64. Zhang JG, Ho T, Callendrello AL, Crespi CL, Stresser DM. A multi-endpoint evaluation of cytochrome P450 1A2, 2B6 and 3A4 induction response in human hepatocyte cultures after treatment with β -naphthoflavone, phenobarbital and rifampicin. *Drug Metab Lett*. 2010;4(4):185-194.
65. Pascussi JM, Robert A, Nguyen M, et al. Possible involvement of pregnane X receptor-enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest*. 2005;115(1):177-186.
66. Parkinson A, Mudra DR, Johnson C, Dwyer A, Carroll KM. The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;199(3):193-209.
67. LeCluyse E, Madan a, Hamilton G, Carroll K, DeHaan R, Parkinson a. Expression and regulation of cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes. *J Biochem Mol Toxicol*. 2000;14(4):177-188.

68. Sheiner LB, Beal SL. Pharmacokinetic parameter estimates from several least squares procedures: superiority of extended least squares. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1985;13(2):185-201.
69. Sheiner LB, Grasela TH. Experience with NONMEM: analysis of routine phenytoin clinical pharmacokinetic data. *Drug Metab Rev.* 1984;15(1-2):293-303.
70. Wang YH. Confidence assessment of the Simcyp time-based approach and a static mathematical model in predicting clinical drug-drug interactions for mechanism-based CYP3A inhibitors. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(7):1094-1104.
71. Friedman EJ, Fraser IP, Wang Y-H, et al. Effect of Different Durations and Formulations of Diltiazem on the Single-Dose Pharmacokinetics of Midazolam: How Long Do We Go? *J Clin Pharmacol.* 2011;51(11):1561-1570.
72. Acocella G. Clinical pharmacokinetics of rifampicin. *Clin Pharmacokinet.* 1978;3(2):108-127.
73. Acocella G, Pagani V, Marchetti M, Baroni G, Nicolis F. Kinetic studies on rifampicin. I. Serum concentration analysis in subjects treated with different oral doses over a period of two weeks. *Chemotherapy.* 1971;16:356-370.
74. Ourlin JC, Lasserre F, Pineau T, et al. The small heterodimer partner interacts with the pregnane X receptor and represses its transcriptional activity. *Mol Endocrinol.* 2003;17(9):1693-1703.
75. Li T, Chiang JYL. RIFAMPICIN INDUCTION OF CYP3A4 REQUIRES PREGNANE X RECEPTOR CROSS with hepatocyte nuclear factor 4a and coactivators and suppression of small heterodimer partner gene expression. *Drug Metab Dispos.* 2006;34:756-764..
76. Acocella G, V P, M M, G.C B, F.B N. Kinetic studies on rifampicin. I. Serum concentration analysis in subjects treated with different oral doses over a period of two weeks. *Chemotherapy.* 1971;16(6):356-370.
77. Yang J, Yan B. Photochemotherapeutic Agent 8-Methoxypsoralen Induces Cytochrome P450 3A4 and Carboxylesterase HCE2: Evidence on an Involvement of the Pregnane X Receptor. *Toxicol Sci.* 2007;95(1):13-22.
78. Song SH, Chang HE, Jun SH, et al. Relationship between CES2 genetic variations and rifampicin metabolism. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(6):1281-1284.
79. Chen Y, Ferguson SS, Negishi M, Goldstein J a. Induction of human CYP2C9 by rifampicin, hyperforin, and phenobarbital is mediated by the pregnane X receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;308(2):495-501.
80. Nakajima A, Fukami T, Kobayashi Y, Watanabe A, Nakajima M, Yokoi T. Human arylacetamide deacetylase is responsible for deacetylation of rifamycins: rifampicin, rifabutin, and rifapentine. *Biochem Pharmacol.* 2011;82(11):1747-1756.
81. Xie W, Yeuh M-F, Radominska-Pandya A, et al. Control of steroid, heme, and

- carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(7):4150-4155.
82. Furesz S, Scotti R, Pallanza R, Mapelli E. Rifampicin a new rifamycin. 3. Absorption, distribution, and elimination in man. *Arzneimittelforschung*. 1967;17:534-537.
 83. Poulin P, Theil F-P. Prediction of pharmacokinetics prior to in vivo studies. 1. Mechanism-based prediction of volume of distribution. *J Pharm Sci*. 2002;91(1):129-156.
 84. Yang J, Liao M, Shou M, et al. Cytochrome p450 turnover: regulation of synthesis and degradation, methods for determining rates, and implications for the prediction of drug interactions. *Curr Drug Metab*. 2008;9(5):384-394.
 85. Chung JY, Cho JY, Lim HS, et al. Effects of pregnane X receptor (NR1I2) and CYP2B6 genetic polymorphisms on the induction of bupropion hydroxylation by rifampin. *Drug Metab Dispos*. 2011;39(1):92-97.
 86. Niemi M, Backman JT, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Kivistö KT. Rifampin decreases the plasma concentrations and effects of repaglinide. *Clin Pharmacol Ther*. 2000;68(5):495-500.
 87. Heimark LD, Gibaldi M, Trager WF, O'Reilly RA, Goulart DA. The mechanism of the warfarin-rifampin drug interaction in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 1987;42(4):388-394.
 88. O'Reilly RA. Interaction of sodium warfarin and rifampin. *Ann Intern Med*. 1974;81(3):337.
 89. Chen J, Raymond K. Roles of rifampicin in drug-drug interactions: underlying molecular mechanisms involving the nuclear pregnane X receptor. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006;5:3.
 90. Li J, Zhao M, He P, Hidalgo M, Baker SD. Differential metabolism of gefitinib and erlotinib by human cytochrome P450 enzymes. *Clin Cancer Res*. 2007;13(12):3731-3737.
 91. Nebot N, Crettol S, d'Esposito F, Tattam B, Hibbs DE, Murray M. Participation of CYP2C8 and CYP3A4 in the N-demethylation of imatinib in human hepatic microsomes. *Br J Pharmacol*. 2010;161(5):1059-1069.
 92. Zhang Z-Y, Chen M, Chen J, Padval M V, Kansra V V. Biotransformation and in vitro assessment of metabolism-associated drug-drug interaction for CRx-102, a novel combination drug candidate. *J Pharm Biomed Anal*. 2009;50(2):200-209.
 93. Visser SAG, Alwis DP De, Kerbusch T, Stone JA, Allerheiligen SRB. Implementation of Quantitative and Systems Pharmacology in Large Pharma. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2014;3(October):e142.
 94. Rostami-Hodjegan A. Physiologically Based Pharmacokinetics Joined With In Vitro–In Vivo Extrapolation of ADME: A Marriage Under the Arch of Systems

- Pharmacology. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(1):50-61.
95. van Hasselt JGC, van der Graaf PH. Towards integrative systems pharmacology models in oncology drug development. *Drug Discov Today Technol.* 2015;15:1-8.
 96. Ghosh S, Matsuoka Y, Asai Y, Hsin K-Y, Kitano H. Software for systems biology: from tools to integrated platforms. *Nat Rev Genet.* 2011;12(12):821-832.
 97. Asai Y, Suzuki Y, Kido Y, et al. Specifications of insilicoML 1.0: a multilevel biophysical model description language. *J Physiol Sci.* 2008;58(7):447-458.
 98. Ohno Y, Hisaka A, Suzuki H. General framework for the quantitative prediction of CYP3A4-mediated oral drug interactions based on the AUC increase by coadministration of standard drugs. *Clin Pharmacokinet.* 2007;46(8):681-696.
 99. Ohno Y, Hisaka A, Ueno M, Suzuki H. General framework for the prediction of oral drug interactions caused by CYP3A4 induction from in vivo information. *Clin Pharmacokinet.* 2008;47(10):669-680.
 100. Chung E, Nafziger AN, Kazierad DJ, Bertino JS. Comparison of midazolam and simvastatin as cytochrome P450 3A probes. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;79:350-361.
 101. Bolton AE, Peng B, Hubert M, et al. Effect of rifampicin on the pharmacokinetics of imatinib mesylate (Gleevec, STI571) in healthy subjects. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004;53(2):102-106.
 102. Kivistö KT, Lamberg TS, Neuvonen PJ. Interactions of buspirone with itraconazole and rifampicin: effects on the pharmacokinetics of the active 1-(2-pyrimidinyl)-piperazine metabolite of buspirone. *Pharmacol Toxicol.* 1999;84(2):94-97.
 103. Kyrklund C, Backman JT, Kivistö KT, Neuvonen M, Laitila J, Neuvonen PJ. Rifampin greatly reduces plasma simvastatin and simvastatin acid concentrations. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;68(6):592-597.
 104. McAllister WA, Thompson PJ, Al-Habet SM, Rogers HJ. Rifampicin reduces effectiveness and bioavailability of prednisolone. *Br Med J.* 1983;286(6369):923-925.
 105. Swaisland HC, Ranson M, Smith RP, et al. Pharmacokinetic drug interactions of gefitinib with rifampicin, itraconazole and metoprolol. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(10):1067-1081.
 106. Villikka K, Kivistö KT, Lamberg TS, Kantola T, Neuvonen PJ. Concentrations and effects of zopiclone are greatly reduced by rifampicin. *Br J Clin Pharmacol.* 1997;43(5):471-474.
 107. Villikka K, Kivistö KT, Luurila H, Neuvonen PJ. Rifampin reduces plasma concentrations and effects of zolpidem. *Clin Pharmacol Ther.* 1997;62(6):629-634.
 108. Villikka K, Kivistö KT, Backman JT, Olkkola KT, Neuvonen PJ. Triazolam is ineffective in patients taking rifampin. *Clin Pharmacol Ther.* 1997;61:8-14.
 109. Holtbecker N, Fromm MF, Kroemer HK, Ohnhaus EE, Heidemann H. The

- nifedipine-rifampin interaction. Evidence for induction of gut wall metabolism. *Drug Metab Dispos.* 1996;24(10):1121-1123.
110. Ridditid W, Wongnawa M, Mahatthanatrakul W, Chaipol P, Sunbhanich M. Effect of rifampin on plasma concentrations of mefloquine in healthy volunteers. *J Pharm Pharmacol.* 2000;52(10):1265-1269.
 111. Shi J, Montay G, Bhargava VO. Clinical pharmacokinetics of telithromycin, the first ketolide antibacterial. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(9):915-934.
 112. Backman JT, Olkkola KT, Neuvonen PJ. Rifampin drastically reduces plasma concentrations and effects of oral midazolam. *Clin Pharmacol Ther.* 1996;59(1):7-13.
 113. Garcia M, Rager J, Wang Q, et al. Cryopreserved human hepatocytes as alternative in vitro model for cytochrome p450 induction studies. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2003;39(7):283-287.
 114. Hariparsad N, Nallani SC, Sane RS, Buckley DJ, Buckley AR, Desai PB. Induction of CYP3A4 by efavirenz in primary human hepatocytes: comparison with rifampin and phenobarbital. *J Clin Pharmacol.* 2004;44(11):1273-1281.
 115. Hariparsad N, Carr B a, Evers R, Chu X. Comparison of immortalized Fa2N-4 cells and human hepatocytes as in vitro models for cytochrome P450 induction. *Drug Metab Dispos.* 2008;36(6):1046-1055.
 116. Li AP, Jurima-Romet M. Applications of primary human hepatocytes in the evaluation of pharmacokinetic drug-drug interactions: evaluation of model drugs terfenadine and rifampin. *Cell Biol Toxicol.* 1997;13(4-5):365-374.
 117. Prueksaritanont T, Richards KM, Qiu Y, et al. Comparative effects of fibrates on drug metabolizing enzymes in human hepatocytes. *Pharm Res.* 2005;22(1):71-78.