

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

目 次

| 課題番号 | | | | |
|-------------------------------|-------|------------------------------------------------------------|-------|-------|
| 71253 20000997A | 71253 | 臨床試験の予見性を高めるための、ヒト組織を用いた医薬品の安全性・有効性評価手法の確立に関する研究 | 大野 泰雄 | …… 1 |
| 20001001A | 72001 | 日本におけるヒト肝細胞の保存・管理に関する基準の検討 | 小林 英司 | …… 10 |
| 20001002A | 72002 | 日本人の肝及び腎の薬物排泄能の個人差と遺伝子多型 | 遠藤 仁 | …… 14 |
| 20001004A | 72003 | ヒト組織新鮮材料を用いた薬物の作用評価の研究 －産学共同のネットワーク作りをめざして－ | 松浦 成昭 | …… 21 |
| 20000998A | 72004 | 高機能保持ヒト由来肝培養細胞株を用いた薬物の有効性、安全性評価法の確立 | 永森 静志 | …… 25 |
| 20001003A | 72005 | ヒト薬物代謝酵素遺伝子多型簡易迅速定量法の臨床応用の新展開 －医薬品の適性使用と医療経済の効率化を目的として－ | 水柿 道直 | …… 29 |
| 20001005A | 72006 | 臓器移植患者におけるP-糖蛋白質及びCYP3A4の定量的解析を基盤とした免疫抑制剤の適正使用法確立に関する研究 | 乾 賢一 | …… 39 |
| 20001000A | 72007 | エンドトキシン作用の種特異性の機構解明と、医薬品の有効性・安全性評価への応用に関する研究 | 棚元 憲一 | …… 45 |
| 20000999A | 72008 | 肝移植により摘出された患者肝細胞の保存方法の確立と病的細胞の分子生物学的解析 | 香坂 隆夫 | …… 55 |

臓器移植患者におけるP-糖蛋白質及びCYP3A4の定量的解析を基盤とした免疫抑制剤の適正使用法確立に関する研究

所属 京都大学医学部附属病院 薬剤部
研究者 乾 賢一

分担研究者

- (1) 京都大学医学部附属病院薬剤部 齋藤秀之、増田智先、橋田 亨
(2) 京都大学医学部附属病院臓器移植医療部 田中紘一、上本伸二

要 旨

臓器移植治療対象症例の小腸組織片に存在する薬物吸収障壁（P-糖蛋白質、CYP3A4）の発現量を定量数値化し、患者個々のタクロリムス体内動態との比較解析を行った。その結果、小腸P-糖蛋白質の発現量を考慮したタクロリムスの投与量設定および投与経路（経口または静注）の決定が臓器移植患者に対する適正なタクロリムス治療を行う上で重要であることが判明した。

1. 研究目的

わが国における移植医療は、最近保険適用の認められた生体肝移植を含め高次医療として着実に成果を上げている。申請者らは京都大学医学部附属病院での生体肝移植治療において、免疫抑制剤タクロリムス（FK-506）の血中濃度モニタリングに携わり、これまで600例を越える術後管理に貢献してきた。しかし、タクロリムスの体内動態については、個体差の大きいこと、種々の併用薬物による相互作用を受けることなど多くの問題点が指摘されており、その適正使用法の確立が緊要とされている。

生体に投与されたタクロリムスは、主として肝臓に発現する薬物代謝酵素（CYP3A4）によって無効化されること、代謝物及び未変化体薬物は引き続き薬物輸送体P-糖蛋白質を介して胆汁中に排泄されることが知られている。また、CYP3A4やP-糖蛋白質は小腸粘膜にも発現しており、経口投与された薬物の吸収過程における障壁として機能すること、すなわち免疫抑制剤の血中濃度を支配する重要な要因と考えられている。

そこで本研究では、生体肝移植患者の小腸に発現するP-糖蛋白質及びCYP3A4を定量的に解析し、患者個々におけるタクロリムス排除能を予測することによって、タクロリムスの有効かつ安全な使用法を確立することを目的として以下の研究計画を実施した。1) 生体肝移植手術時の胆管再建の際に切除される小腸組織片を用い、患者個々の小腸P-糖蛋白質及びCYP3A4発現量を定量的に解析した、2) 得られた結果とタクロリムス体内動態との比較解析を行った。3) また、前年度で報告した症例とは別の生体小腸移植症例を対象に、内視鏡検査の一環として移植片（小腸）生検中のこれら蛋白質の発現量を定量的に解析し、タクロリムス体内動態との比較解析を行った。

さらに、これら分子的・科学的根拠を基盤とした適正なタクロリムス使用法の確立を到達目標とした。

2. 研究方法

(1) ヒト小腸組織の採取と粗膜画分およびtotal RNA画分の抽出

生体肝移植手術における胆管再建の際に切除される小腸組織を試料として用いた。切除後、直ちに液体窒素中で凍結した。凍結組織は37℃で急速に溶解し、粘膜部分を剥離した後に粗膜画分とtotal RNA画分を同時抽出した。得られる粘膜部分が微量である場合や小腸移植患者由来の生検組織を使用する場合には、total RNA画分の抽出を優先した。

(2) ヒト小腸組織に発現するP-糖蛋白質およびCYP3A4の定量：蛋白レベル

P-糖蛋白質の検出は、既に我々が作成したヒトP-糖蛋白質過剰発現細胞 (LLC-GA5-COL150) の粗膜画分を陽性対照として用い、抗P-糖蛋白質モノクローナル抗体 C219 を用いてウエスタンブロッティング法により行った。また、CYP3A4については市販のCYP3A4発現ミクロソーム膜を陽性対照として用い、抗CYP3A4ポリクローナル抗体をプローブとして用いた。データ解析は、それぞれの陽性対照におけるシグナル強度に対する比として評価した。

(3) ヒト小腸組織に発現するP-糖蛋白質およびCYP3A4の定量：mRNAレベル

P-糖蛋白質をコードするMDR1 mRNA およびCYP3A4 mRNAの定量については、昨年度開発した拮抗PCR法を用い、MDR1 mRNA およびCYP3A4 mRNAを同時定量した。

3. 研究成果

(1) ヒトP-糖蛋白質及びCYP3A4の定量解析

生体肝移植対象症例由来の小腸組織片から同時に粗膜画分並びにtotalRNA画分を抽出し、ウエスタンブロッティングによる蛋白レベルでの解析と拮抗PCR法によるmRNAレベルでの解析を行い比較検討した。その結果、mRNAレベルにおける定量解析法は、蛋白レベルにおける検出結果と良好な相関を示すこと、蛋白レベルでの解析に比べより高感度であることが判明した (Figs. 1A and 1B)。さらに拮抗PCR法によるmRNAレベルでの定量解析法は、P-糖蛋白質並びにCYP3A4の発現量を数値化できること、測定間におけるバラツキも極めて小さいことが明らかとなった。一方、蛋白レベルおよびmRNAレベルの何れにおいてもP-糖蛋白質とCYP3A4の発現量に相関関係は認められなかった (Figs. 1C and 1D)。

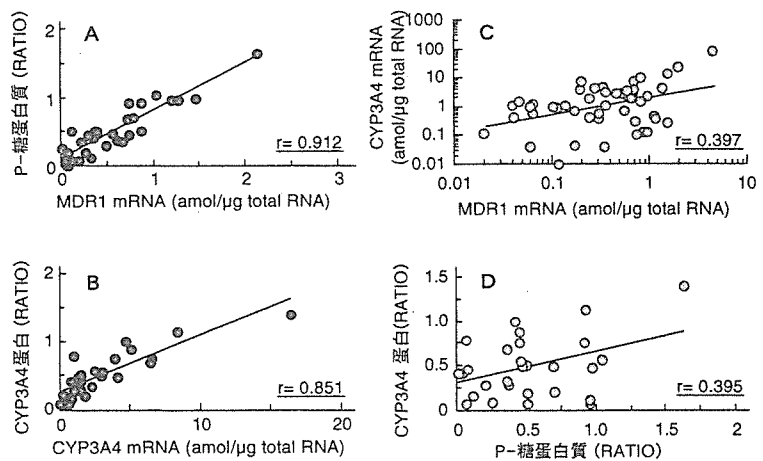


Fig. 1. mRNA及び蛋白レベルでの定量法の比較並びにP-糖蛋白質とCYP3A4との発現量の比較。

一方、蛋白レベルおよびmRNAレベルの何れにおいてもP-糖蛋白質とCYP3A4の発現量に相関関係は認められなかった (Figs. 1C and 1D)。

(2) 生体肝移植患者の小腸組織におけるP-糖蛋白質及びCYP3A4の定量とタクロリム体内動態との比較解析

生体肝移植症例における小腸P-糖蛋白質並びにCYP3A4発現量の定量解析を行った結果、日本人におけるこれらの発現量は、全mRNAのそれぞれ約0.004%、0.01%を占めることが明らかとなった。なお、本研究期間での生体肝移植対象症例における小腸P-糖蛋白質並びにCYP3A4の定量的解析数は、70例となった。その内タクロリムの体内動態に影響を及ぼす薬物を併用せず経口投与のみでタクロリムの血中濃度をコントロールしていた48症例を対象として、以下の研究成果を得た。まず、mRNAレベルにおける小腸P-糖蛋白質並びにCYP3A4の発現量には、大きな個体

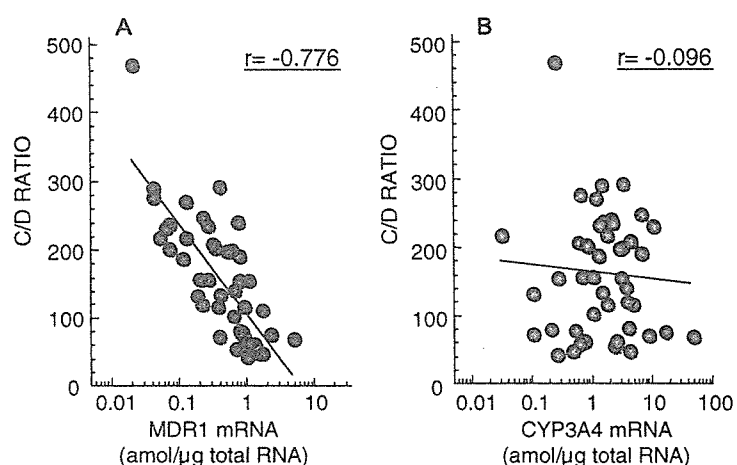


Fig. 2. 生体肝移植患者の小腸MDR1及びCYP3A4mRNAの発現とタクロリム血中濃度/投与量比との相関。

間変動が認められ、その変動域はP-糖蛋白質で約100倍、CYP3A4で約1,000倍であることが示された。また、生体肝移植術直後の7日間における患者一人ひとりのタクロリムストラフ値/経口投与量比 (C/D) とP-糖蛋白質またはCYP3A4の発現量との比較解析を行った。その結果、タクロリムスのC/D比はMDR1 mRNA発現量との間に良好な負の相関関係を示すが ($r=-0.776$)、CYP3A4 mRNA発現量との間には相関関係を示さないこと

($r=-0.096$) が判明した (Fig. 2)。また、患者群をMDR1 mRNAまたはCYP3A4 mRNAの平均値で2群に分け、High MDR1とLow MDR1として比較解析した結果、同程度のタクロリムス血中濃度を得るためにHigh MDR1の患者群はLow MDR1の患者群よりもタクロリムスの投与量を約2倍必要とすることが明らかとなった (Table 1)。

Table 1. 小腸MDR1またはCYP3A4のmRNA発現量による分類とタクロリムス体内動態。

| 分類 | High | Low | P値 |
|----------------------|--------------|--------------|--------|
| MDR1発現による分類 | | | |
| | n=102 | n=99 | |
| 経口投与量 (mg/kg/day) | 0.13 ± 0.01 | 0.07 ± 0.01 | <0.001 |
| タクロリムストラフ値 (ng/mL) | 11.5 ± 0.58 | 11.0 ± 0.52 | 0.476 |
| 血中濃度/投与量比 | 143.8 ± 18.2 | 230.1 ± 20.9 | 0.002 |
| CYP3A4発現による分類 | | | |
| | n=96 | n=105 | |
| 経口投与量 (mg/kg/day) | 0.10 ± 0.01 | 0.10 ± 0.01 | 0.857 |
| タクロリムストラフ値 (ng/mL) | 12.1 ± 0.60 | 10.5 ± 0.49 | 0.042 |
| 血中濃度/投与量比 | 205.4 ± 21.6 | 168.8 ± 18.4 | 0.197 |

(3) 小腸P-糖蛋白質およびCYP3A4発現と生体肝移植患者の予後との比較解析

以上の結果から、小腸P-糖蛋白質の発現量はタクロリムスを中心とした術後管理を行う上で有用な体内動態因子であることが示唆された。タクロリムスを用いた術後の免疫抑制療法は、移植治療の成否を左右する極めて重要な要素であり、患者一人ひとりに対する適切なタクロリムス治療が行われれば生体肝移植治療の成績はさらに向上すると考えられる。すなわち、小腸のP-糖蛋白質やCYP3A4が術後のタクロリムス治療を支配する生体因子として関わっている可能性が考えられる。そこで、小腸P-糖蛋白質またはCYP3A4発現量とレシピエント患者の予後との関係について解析を加えた。

これまで、生体肝移植患者の年齢や移植片の体重に対する比 (graft-to-recipient weight ratio: GRWR) が患者の予後を評価する上で重要な因子であることが木内ら (*Clin. Transpl.*, 18, 191-198, 1997) によって報告されている。本研究の対象とした48例についても同様の解析を行ったところ、移植術時のレシピエントの年齢とGRWRは何れも有意な予後予測因子であることが確認された (Fig. 3)。

次に、小腸P-糖蛋白質およびCYP3A4の発現量と患者の予後との関係について Kaplan-Meier 法による解析を行ったところ、小腸P-糖蛋白質の発現量が低い患者群は高い患者群と比較して有意に生存率が高いことが判明した (Fig. 4A)。一方、CYP3A4に基づいた患

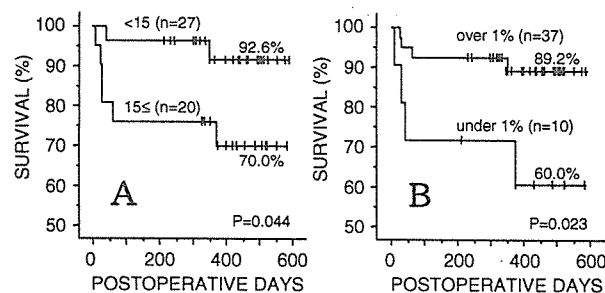


Fig. 3. 生体肝移植患者の術時年齢 (A) 及びGRWR (B) と生存率。

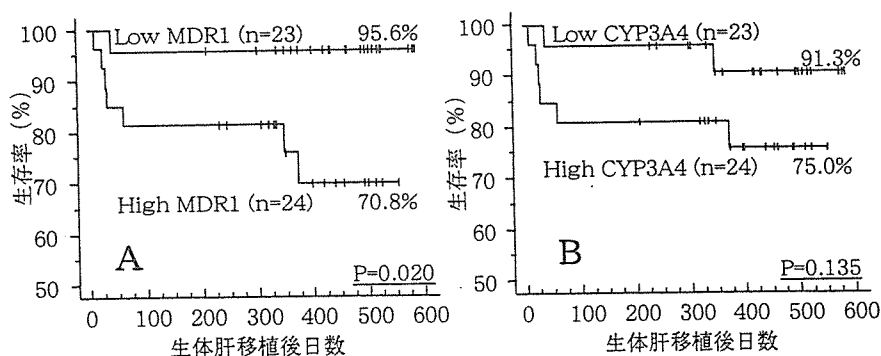


Fig. 4. 生体肝移植患者の小腸MDR1 (A) 及びCYP3A4 mRNA (B) の発現と生存率。

者群間での比較は、有意な結果を与えなかった (Fig. 4B)。

さらに、コックス比例ハザードモデルによる相対危険率の算出を行った結果、生体肝移植患者の小腸上皮細胞に発現するMDR1 mRNAの発現量は、予後の危

Table 2. コックス比例ハザードモデルによる生体肝移植予後予測因子としてのMDR1 mRNA発現量の評価。

| 因子 | 相対危険率 (95% 信頼区間) | P 値 |
|----------------------------------|-----------------------|-------|
| すべての因子をパラメータとして解析した場合 | | |
| MDR1 mRNA 発現量 | 12.99 (1.64 - 103.23) | 0.015 |
| CYP3A4 mRNA 発現量 | 0.93 (0.87 - 1.00) | 0.044 |
| GRWR | 0.04 (0.00 - 0.45) | 0.01 |
| 術時の年齢 | 1.00 (0.95 - 1.06) | 0.909 |
| MDR1 mRNA発現とGRWRとをパラメータとして解析した場合 | | |
| MDR1 mRNA 発現量 | 1.63 (1.08 - 2.46) | 0.021 |
| GRWR | 0.22 (0.05 - 0.86) | 0.03 |

険因子となり得ることが示された (相対危険率 12.99, P=0.015)。また、GRWR は逆危険因子であることが確認された (相対危険率 0.04, P=0.01) (Table 2)。

(4) 小腸移植患者の小腸生検における P-糖蛋白質および CYP3A4 の定量解析

前年度で報告したとおり、生体小腸移植患者の小腸生検における P-糖蛋白質発現量はタクロリムスの C/D 比と良好に逆相関したが、CYP3A4 の発現量との相関関係は認められなかった。さらに、小腸 P-糖蛋白質の発現は、拒絶反応からの小腸組織再生の過程で一過性に亢進することが示唆された。そこで本年度では、別の症例において同様の解析を行い本研究成果の臨床応用の可能性について検討を行った。

別の小腸移植症例を対象に移植片の内視鏡検査の一環として採取された生検の一部を用い、P-糖蛋白質および CYP3A4 の発現量を定量した。その結果、前年度で認められたように P-糖蛋白質および CYP3A4 の発現量は大きく変動した。また、移植片小腸の手術時の虚血再灌流によって、障害を受けたと考えられる小腸組織の回復過程において P-糖蛋白質の発現量は一過性に亢進することが本症例でも認められた (Fig. 5)。従って、術後のタクロリムスの投与経路について小腸 P-糖蛋白質の発現量が高い場合には静注を主に、P-糖蛋白質の発現量が術時レベルまで低下した後は経口を主とするように投与経路を決定した結果、本症例のタクロリムス血中濃度は良好に保たれた。

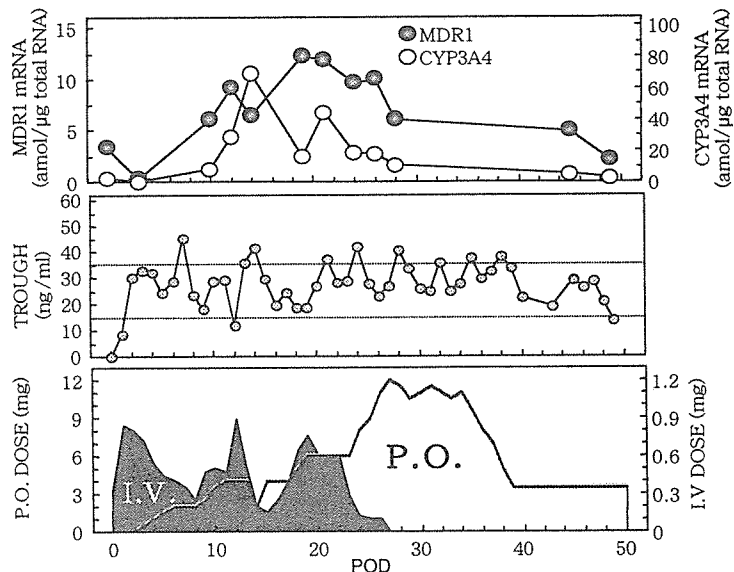


Fig. 5. 小腸P-糖蛋白質及びCYP3A4発現 (A) とタクロリムス投与量 (B)、トラフ値の推移 (C)。

(5) モデル動物を用いた解析

移植小腸の状態と小腸 P-糖蛋白質の発現量との関係について詳細に理解するために、小腸移植モデルラットを用いて拒絶反応と小腸 P-糖蛋白質の発現量との関係について解析を行った。まず、急性拒絶反応のモデル (ドナー, Brown Norway; レシピエント, Lewis) では、拒絶反応の進行と共に小腸上皮細胞の脱落と P-糖蛋白質発現量の低下とが観察されたが、拒絶反応の起こらないモデル (ドナー, レシピエント共, Lewis) では、術後一過性に *mdr1b* mRNA の発現量が亢進しており、臨床で得られた結果と対応するものを得た。

(6) 培養細胞を用いた解析

小腸移植症例における拒絶反応並びに術後の虚血再灌流からの小腸組織再生に伴って、小腸 P-糖蛋白質の発現量が一過性に亢進していたことから、細胞増殖と P-糖蛋白質発現との関係に着目し、ヒト腸由来培養細胞 Caco-2 を用いた検討を行った。Fig. 6 に示すように播種後早期から MDR1 mRNA の発現量が高いこと、一方ハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ mRNA の発現量は一定であることが明らかとなった。さらに、蛋白レベルにおける解析からも対応する結果を得、小腸 P-糖蛋白質の発現量は上皮細胞の増殖の程度と良好な正の相関関係を有していることが明らかとなり、臨床で得られた結果を説明しうる現象を確認した。

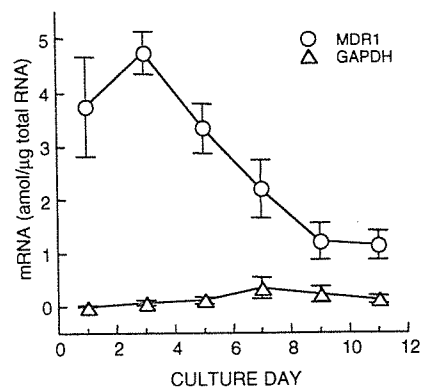


Fig. 6. Caco-2細胞におけるMDR1 mRNA 発現変動と培養日数との関係。

4. 考察

本研究では小腸に存在し、タクロリムスなどの吸収障壁として機能すると考えられている薬物輸送体 P-糖蛋白質および代謝酵素 CYP3A4 の発現量を定量数値化し、臓器移植患者における適正なタクロリムス使用法の確立を目指した。

本研究期間において書面によるインフォームド・コンセントが得られ、術時の小腸組織を用いた P-糖蛋白質および CYP3A4 発現量を測定した症例は 70 例であった。その中で、術後経口投与のみでタクロリムス治療が行われた症例は 48 例であった。この 48 例を対象に小腸 P-糖蛋白質および CYP3A4 発現量とタクロリムスの C/D 比とを比較したところ、小腸 P-糖蛋白質の発現量は、生体肝移植患者におけるタクロリムス体内動態の個人差（個体間変動）を理解するための重要な生体因子の一つであることが明らかとなった。一方、CYP3A4 の発現量は、タクロリムス治療に対する指標となり得ないことが示された。また、生体小腸移植症例における検討の結果、術後小腸 P-糖蛋白質の発現量は一過性に上昇した後術時レベルまで低下しており、タクロリムス体内動態の同一患者内における変動（個体内変動）を説明する上で重要な生体因子の一つであることも示唆された。そこで本年度における症例では、昨年度で得られた経験を踏まえて小腸 P-糖蛋白質の発現量を参考にしながらタクロリムスの投与経路の選択を行った結果、良好な術後経過を認めた。従って、小腸移植患者における移植片 P-糖蛋白質の定量数値化とそれに基づくタクロリムスの投与経路選択は、小腸移植患者に対する有用なタクロリムス投与方法であり今後の小腸移植治療の成績向上に寄与するものと考えられた。これらの結果から、生体肝移植患者および小腸移植患者における小腸 P-糖蛋白質の発現量の定量は、タクロリムスによる免疫抑制を主とした術後管理において有用な薬物動態学的情報を与えることが明らかとなった。

本研究期間中に実施された 2 例の生体小腸移植患者を対象に、小腸 P-糖蛋白質の発現量定量とタクロリムス体内動態との比較解析を行った。その中で、拒絶反応からの組織再生過程や術後の虚血再灌流障害からの回復過程において著明な小腸 P-糖蛋白質の発現誘導とそれに伴うタクロリム C/D 比の低下が認められた。これらの結果は、一過性に亢進した小腸 P-糖蛋白質によるタクロリムスの小腸からの吸収低下に起因することが考えられた。そこで、小腸移植モデルラットを用いて移植片小腸に存在する P-糖蛋白質の発現変動について調べた結果、術後早期に一過性の P-糖蛋白質発現亢進が認められた。また、ヒト培養腸上皮細胞 Caco-2 を用いて P-糖蛋白質発現変動と細胞増殖との関係について検討した結果、播種後の増殖速度と P-糖蛋白質発現量との間に良好な正の相関関係が認められた。従って、拒絶反応や虚血再灌流という組織障害からの回復過程、すなわち上皮細胞の増殖過程において小腸 P-糖蛋白質は誘導を受けること、この誘導がタクロリムスの吸収率低下に関わることが推察された。今後、細胞増殖期における MDR1 mRNA の転写調節因子を明らかにすることによって小腸 P-糖蛋白質発現量の制御が可能となり、より効果的なタクロリムス投与方法の確立が可能になると考えられる。

現在、生体肝移植治療における術後 1 年間の患者生存率は 80% を越えており、世界中から高い評価を得ているが、それを支えるのは術後のタクロリムスを中心とした十分な免疫抑制治療である。従って、患

者一人ひとりに対する不適切な免疫抑制剤治療は、移植治療の成績向上を妨げる一因と考えられる。本研究において術時のP-糖蛋白質発現量は、タクロリムス体内動態との良好な逆相関を示した。すなわち、小腸P-糖蛋白質の発現が高い患者群においてはタクロリムスの血中濃度維持が困難となり、移植肝の生着に支障を来すと考えられる。Fig. 4に示すように、小腸P-糖蛋白質の高い患者群では低い患者群よりも術後の生存率が低いという結果が得られた。さらに、コックス比例ハザードモデルによる解析結果から、小腸P-糖蛋白質は、生体肝移植患者における有意な危険因子として示された (Table 2)。これらの結果は、小腸P-糖蛋白質の発現が高い患者群では、術後早期におけるタクロリムスの血中濃度維持が困難であり、術後管理にさらなる注意を要することを示唆するものと考えられる。現時点では、直接的に小腸P-糖蛋白質の発現量と患者の生存率との間に関わりがあるのか否かについては明らかではない。今後、小腸P-糖蛋白質の発現とタクロリムスの標的蛋白であるFK-binding proteinや種々免疫担当細胞中の遺伝子群の発現プロファイルや遺伝子多型を詳細に調べることにより、P-糖蛋白質を含む移植治療に対して影響を及ぼす遺伝子群が特定されると同時に、患者一人ひとりのタクロリムスに対する感受性（薬物応答性）も考慮に入れた治療方法の確立が可能になると考える。

5. 結論

以上、我々は臓器移植患者由来の小腸組織における異物解毒蛋白P-糖蛋白質及びCYP3A4の発現量の定量数値化に成功し、タクロリムス体内動態との比較解析を行った。その結果、CYP3A4よりもむしろP-糖蛋白質の発現量が術後のタクロリムス治療を行う上で有用な生体因子であること、小腸P-糖蛋白質の発現量は生体肝移植患者の予後予測因子となり得ることを明らかとした。さらに、小腸P-糖蛋白質の発現量が小腸移植患者におけるタクロリムスの投与経路選択のための重要な指標になることを見出した。すなわち、生体肝移植並びに小腸移植という臓器移植治療を受けた患者群におけるタクロリムス体内動態を支配する生体因子として小腸P-糖蛋白質の役割が明らかとなり、本研究結果が適正なタクロリムス治療を進める上での科学的根拠として有用であることが示唆された。今後、タクロリムスに対する感受性の個体差に関わる生体因子群の探索・同定を新たに展開することによって、薬効発現の個体差に基づくタクロリムスの有効治療域設定の個別化とP-糖蛋白質などの体内動態支配因子の個体間・個体内変動に基づく投与設計の両立が可能となり、臓器移植医療の発展と一般医療化に貢献する事ができると考える。

本研究成果は、臓器移植患者における有効かつ安全な免疫抑制剤の使用法確立のための貴重な基礎情報を提供するものと考えられる。

6. 研究発表

1. Masuda, S., Uemoto, S., Hashida, T., Inomata, Y., Tanaka, K., and Inui, K.: Effect of intestinal P-glycoprotein on daily tacrolimus trough level in a living-donor small bowel recipient. *Clin Pharmacol Ther* (2000) 68 (1), 98-103.
2. Hashida, T., Masuda, S., Uemoto, S., Saito, H., Tanaka, K., and Inui, K.: Pharmacokinetic and prognostic significance of intestinal MDR1 expression in recipients of living-donor liver transplantation. *Clin Pharmacol Ther* (2001) 69 (5) [印刷中] .
3. Motohashi, H., Masuda, S., Katsura, T., Saito, H., Sakamoto, S., Uemoto, S., Tanaka, K., and Inui, K.: Expression of peptide transporter following intestinal transplantation in the rat. *J Surg Res* (2001) [印刷中] .
4. Masuda, S., Uemoto, S., Hashida, T., Saito, H., Kiuchi, T., Egawa, H., Tanaka, K., and Inui, K.: Up-regulation of intestinal P-glycoprotein and immunosuppressant trough levels in a recipient of living-donor liver transplantation. [投稿中] .

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第7分野

ヒト組織を用いた薬物の有効性、安全性に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社