

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

副作用発現回避を目的とした代謝物発現プロファイル
及び薬剤反応性遺伝子の解析

平成14年度 総括研究報告書

主任研究者 平塚 真弘

平成15（2003）年4月

目 次

I. 総括研究報告	
副作用発現回避を目的とした代謝物発現プロファイル及び 薬剤反応性遺伝子の解析	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 4

副作用発現回避を目的とした代謝物発現プロファイル及び薬剤反応性遺伝子の解析

主任研究者 平塚 真弘 東北薬科大学講師

研究要旨

本研究は、薬剤反応性遺伝子の一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism; SNP）が代謝物発現プロファイルや副作用発現にどのように影響するかを解析し、トキシコゲノミクス及びトキシコメタボロミクスの情報をより効果的かつ安全な薬物療法に利用するために立案した。特に本研究では多くの薬物の代謝に関与していると考えられている薬物代謝酵素 CYP3A4 の基質薬物である抗血小板薬シロスタゾールの代謝物プロファイルの個人差を検討した。その結果、定常状態におけるシロスタゾールとその主要代謝物の血中トラフ濃度は約 16 倍から 33 倍の個人差が認められた。また、代謝物と親化合物の比をプロビット解析したところ、二相性の代謝能の存在が示唆された。現在、それらの薬物動態に関連すると考えられる薬剤反応性遺伝子（CYP3A4、CYP3A5、CYP2D6、CYP1A2、CYP2B6、MDR1、PXR、RXR）の既知 SNP 約 200 箇所についてハイスループット相関解析を行っている。

A. 研究目的

ある種の薬物を服用すると、副作用が発現しやすい人たちが存在する。この要因として、肝や小腸の薬物代謝酵素であるチトクロームP450 (CYP) やCYP以外の代謝酵素が遺伝的に機能低下していることが最近報告されている。また、副作用発現の感受性に関しても、幾つかの遺伝的背景が原因となることがある。したがって、ファルマコゲノミクスやトキシコゲノミクス研究は、厚生労働省が推進する医薬品の適正使用という点で、重篤な副作用発現回避やQOLの低下防止に貢献することが期待されている。しかし、これまでに薬剤反応性遺伝子のSNPがトキシコメタボロミクスの側面で、どのような影響を及ぼしているかを詳細に解析した例はほとんど存在しない。特に広範な薬物の代謝酵素として知られるCYP3A4の機能や発現量に影響するSNPに関しては、統一した見解が得られていないのが現状である。もし、遺伝子診断や代謝物発現プロファイルの情報が副作用発現

予測に応用できるなら、より安全かつ効果的な薬物療法が行われ、国民医療に貢献できると考えられる。本研究では当該年度にCYP3A4の基質薬物である抗血小板薬シロスタゾールをモデル薬物として、その代謝物プロファイルや副作用発現に影響を及ぼす薬剤反応性遺伝子のSNP解析を行う。このことにより、CYP3A4で代謝される薬物の体内動態がどのような因子により影響を受けるかが明らかとなり、薬剤効果や副作用発現の予測を支援できると考えられる。

B. 研究方法

研究開始年となる平成 14 年度は薬剤反応性遺伝子 SNP と代謝物発現プロファイル、副作用発現の相関解析を行った。はじめに CYP3A4 の基質薬物である抗血小板薬シロスタゾールの血中代謝物プロファイルを解析するために、HPLC を用いた定量システムを構築した。分析対象物質は親化合物であるシロスタゾールの他に、主要代謝物産物

OPC-13015 及び OPC-13213 とした。解析対象人数はシロスタゾール既投与患者 32 人とした。シロスタゾール 100mg を 1 日 2 回、1 週間以上服用し、薬物血中濃度が定常状態となっている患者の末梢血を採取した。採血ポイントは早朝薬物投与前のトラフレベルとした。薬物血中濃度測定用に使用する採血管は抗血液凝固剤を含まないものを用い、採血後直ちに血清を遠心分離した。得られた血清に内標準物質 (OPC-3930) を加え攪拌し、さらに H₂O を加え攪拌後、固相抽出カラム CHEM ELUT CE1003 に試料をアプライし、数分間静置した。その後クロロホルムで試料を溶出し、その試料を固相抽出カラム Sep-Pak Plus に吸着し、酢酸エチルで洗浄後、クロロホルム：メタノール (70:30) で溶出した。得られた試料を乾固後、25%アセトニトリルで溶解し、定量分析用試料とした。HPLC は Waters アライアンス 2695 を用いた。溶出条件はポンプ 1 側に 25%アセトニトリル、ポンプ 2 側に 60%アセトニトリルを置き、20 分でポンプ 2 の溶媒が 68%となるようなリニアグラジエント溶出を行った。流速は 1 mL/min とし、カラムは Waters Symmetry 5 μ m C18 カラム (3.9x150mm) を用いた。カラム温度は 40°C、サンプル温度は 10°C とし、254nm で測定を行った。また、薬物血中濃度測定用の血液とは別に抗血液凝固剤入りの採血管を用い DNA 及び RNA 抽出用の血液試料を採取し、常法によりそれぞれを抽出し、薬剤反応性遺伝子の SNP 解析及び mRNA 発現解析の試料とした。

(倫理面への配慮)

今回の研究プロトコールは本邦における「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、東北大学医学部倫理委員会に申請・承認された課題名「薬剤反応性遺伝子の多型性が薬効及び薬物動態に与える影響に関する研究」に従って実施された。なお、この研究課題は東北大学医学部附属病院薬剤部教授・後藤順一（本研究では研

究協力者）が研究責任者となり、本補助金申請者・平塚真弘はその分担研究者となっている。東北薬科大学での遺伝子解析は、現時点では倫理委員会が存在しないために、それらのすべてを東北大学医学部倫理委員会で承認されたプロトコールに従ったが、平成 15 年度、東北薬科大学においても倫理委員会の設置が決定されており、直ちに審査を受ける予定である。また、今回使用するサンプルは、東北大学医学部附属病院受診の患者に対し、研究内容の十分な説明と書面による同意（インフォームドコンセント）が得られたものを用いた。説明と同意は東北大学医学部附属病院における研究協力者の医師（佐藤成、秋元弘治）又は薬剤師（菱沼隆則、岸川幸生）によって行われた。これらのサンプル採取に際しては、強制的な圧力がかからぬように十分留意し、完全な自由意志のもとで行われた。また、研究対象者に対する人権擁護上の配慮をするにあたり、すべてのサンプルは連結可能匿名化あるいは連結不可能匿名化を行った後、取り扱うこととし、一切の個人情報漏洩されないようにした。よって、研究対象者に対する不利益は生じにくいと考えられた。

C. 研究結果

シロスタゾールとその主要代謝物である OPC-13015 及び OPC-13213、また内標準物質 (OPC-3930) の溶出時間は、それぞれ 14.0 分、12.3 分、3.9 分、10.0 分であり、鋭利で良好なピーク分離が確認された。シロスタゾール既投与患者 32 人の薬物血中濃度は、シロスタゾールが平均値 831.4 ng/mL (最大値 2379.8 ng/mL、最小値 95.9 ng/mL)、OPC-13015 が 330.8 ng/mL (最大値 878.3 ng/mL、最小値 26.7 ng/mL)、OPC-13213 が 284.4 ng/mL (最大値 854.4 ng/mL、最小値 51.4 ng/mL) であり、もっとも高値を示した人と最も低値を示した人の差はシロスタゾールで 24.8 倍、OPC-13015 で 32.9 倍、OPC-13213 で 16.6 倍であり、

顕著な個人差が確認された。副作用（頭痛）を示した患者は1名であり、各薬物血中濃度はいずれも中央値付近であった。副作用を呈した症例が少なかったため親化合物や代謝物の血中濃度と副作用の相関性の解析することはできなかった。次に、各主要代謝物の薬物血中濃度を親化合物シロスタゾールで除した代謝比を算出し、それらの値をプロビット解析すると、特にOPC-13213/シロスタゾール比0.5付近で強い二相性の分離点が観察された。また、OPC-13015/シロスタゾール比0.5付近でも弱い二相性の分離点が観察された。

D. 考察

今回の検討により、シロスタゾールからOPC-13213やOPC-13015に代謝される際に、Extensive MetabolizerとPoor Metabolizerが存在することが示唆された。この原因としては、シロスタゾールの代謝に関与するCYP3A4を代表とする種々の薬物代謝酵素や薬物トランスポーター遺伝子のSNPの存在、あるいはmRNAレベルでの発現量の差が示唆された。現在までにOPC-13015代謝にはCYP3A4、CYP2D6、CYP1A2が、OPC-13213代謝にはCYP2B6の関与が明らかにされている。これ以外のCYPが代謝に関与している可能性もあるが、少なくともこれらのCYP分子腫のSNP解析を行うことは、シロスタゾール代謝の個人差を解明し、副作用発現回避のシステムを構築するためにも有益であると考えられる。現在は、CYP3A4、CYP2D6、CYP1A2、CYP2B6、CYP3A5、MDR1、PXR、RXR等のシロスタゾール代謝に関与すると考えられる薬剤反応性遺伝子の既知SNP解析を進行中である。また、これらの白血球中mRNA量を定量することにより、シロスタゾールの薬物体内動態が予測可能か

否かを検討しており、平成15年度に報告予定である。

E. 結論

薬物代謝酵素CYP3A4の基質薬物である抗血小板薬シロスタゾールとその主要代謝物であるOPC-13015及びOPC-13213の血中濃度を連続投与におけるトラフレベルで測定した。32人の薬物投与患者において、顕著な薬物濃度の個人差が認められた。この原因としてはシロスタゾール代謝に関与する薬物代謝酵素（CYP3A4、CYP2D6、CYP1A2、CYP2B6）や薬物トランスポーター（MDR1）またはそれらの発現を調節している核内レセプター（PXR、RXR）遺伝子のSNPの存在や発現量の差が影響していることが示唆された。それらの遺伝子解析に関しては現在進行中である。本研究をさらに推進し、シロスタゾールのようなCYP3A4で代謝される薬物の体内動態がどのような因子により影響を受けるかが明らかとなれば、多くの薬剤の効果や副作用発現の予測を支援できると期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究成果の刊行に関する一覧

書籍、雑誌とも特になし