

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

平成17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1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

第3分野

医薬品等開発のためのレギュラトリーサイエンスに関する研究

第4分野

創薬に係る臨床研究ならびに稀少疾病治療薬等の開発に関する研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

第6分野

医療材料および製剤設計技術の開発に関する研究

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

第 1 分野

課題番号

KH11001	バイオフィotonクスを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発	川西 徹 ……	1
KH11002	成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発	緒方 勤 ……	11
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(総合研究報告)	松田潤一郎 ……	13
KH11003	創薬研究基盤としての新規発生工学技術の開発に関する研究(平成17年度報告)	松田潤一郎 ……	17
KH12072	変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発	野口博司 ……	25

第 2 分野

KH21004	動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発	望月直樹 ……	31
KH21005	遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究	田上昭人 ……	35
KH21006	病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明	井上和秀 ……	47
KH21007	蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立	桃井 隆 ……	58
KH21008	高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索	小川誠司 ……	66
KH21009	脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	花田賢太郎 ……	70
KH21010	繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG 1 蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明	香坂隆夫 ……	77
KH21011	血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 ……	86
KH21012	コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用	矢野友啓 ……	96
KH21013	免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索	阿部 淳 ……	102
KH21014	受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究	藤本純一郎 ……	108
KH21015	細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用	江崎 治 ……	113
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(総合研究報告)	野々垣勝則 ……	117
KH21016	過食の病態関連因子の解明と抗過食薬の創薬探索に関する研究(平成17年度報告)	野々垣勝則 ……	120

KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（総合研究報告）	田平 武 …… 124
KH21017	慢性ストレス負荷によるうつ病様病態の発症分子機構の解明と創薬（平成17年度報告）	田平 武 …… 129
KH21018	アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析	中山 耕造 …… 134
KH21019	創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究	上出 利光 …… 142
KH21021	エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究	西島 正弘 …… 148
KH21022	ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発	鈴木 哲朗 …… 152
KH21023	末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究	葛西 正孝 …… 156
KH21101	DNAマイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究	佐藤 準一 …… 160
KH22073	機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明	功刀 浩 …… 167
第3分野		
KH31024	超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立	吉岡 澄江 …… 175
KH31025	生薬及び漢方処方の科学的品質保証に関する研究	合田 幸広 …… 185
KH31026	食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究	工藤 由起子 …… 194
KH31027	ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築	能美 健彦 …… 200
KH31028	ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用－非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立－	吉里 勝利 …… 210
KH31029	高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究	檜山 行雄 …… 218
KH31030	患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクスの手法の開発に関する研究	斎藤 嘉朗 …… 226
KH31031	細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発	山口 照英 …… 235
KH31032	医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究	林 讓 …… 243
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（総合研究報告）	頭金 正博 …… 252
KH31033	医薬品適正使用のためのヒト薬物動態評価法の開発と応用（平成17年度報告）	頭金 正博 …… 257
KH31034	プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発	川崎 ナナ …… 261

KH31035	生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究	内田恵理子 …… 271
KH31036	臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究	東 純一 …… 281
KH32074	IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築	永井洋士 …… 288
第4分野		
KH41037	抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用	網脇祥子 …… 307
KH41038	ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発	梶 龍児 …… 315
KH42075	熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究	名和行文 …… 319
第5分野		
KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法（DLI）の実用化	藤原成悦 …… 327
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（総合研究報告）	安枝 浩 …… 336
KH51040	アレルギーによる室内環境汚染の実態を評価する方法、および汚染の制御方法の開発に関する研究（平成17年度報告）	安枝 浩 …… 342
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 …… 349
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 …… 359
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 …… 367
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 …… 372
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 …… 376
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 …… 383
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（総合研究報告）	竹森利忠 …… 387
KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチンデリバリーの開発（平成17年度報告）	竹森利忠 …… 395
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 …… 401
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 …… 406

KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 …… 410
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 …… 418
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 …… 422
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 …… 428
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 …… 431
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（総合研究報告）	鈴木孝昌 …… 437
KH51056	プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究（平成17年度報告）	鈴木孝昌 …… 442
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 …… 452
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 …… 459
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 …… 464
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（総合研究報告）	浅沼秀樹 …… 466
KH52076	インフルエンザ治療型単鎖抗体の開発に関する研究（平成17年度報告）	浅沼秀樹 …… 471
第6分野		
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 …… 479
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 …… 500
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 …… 511
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（総合研究報告）	澁谷統壽 …… 516
KH61062	疾患特異的T細胞吸着材の開発（平成17年度報告）	澁谷統壽 …… 524
第7分野		
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法確立に関する研究	乾 賢一 …… 531
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 …… 540
KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究ーヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作りー（総合研究報告）	松浦成昭 …… 548

KH71065	創薬、臨床検査開発のためのヒト組織の有用性に関する研究－ヒト組織バンクの効率的運用のためのネットワーク作り－（平成17年度報告）	松浦成昭 …… 554
KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 559
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（総合研究報告）	森川 馨 …… 569
KH71067	EBMに基づく医薬品の安全性・有効性を確立するための大規模臨床データに関する学術情報の解析、評価に関する研究（平成17年度報告）	森川 馨 …… 575
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間正充 …… 591
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森静志 …… 601
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾和人 …… 611
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野泰雄 …… 617
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田康文 …… 628
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（総合研究報告）	小林真一 …… 634
KH72078	ヒト組織提供医療機関としてのバンクシステム効率化と研究資源高度化に関する研究（平成17年度報告）	小林真一 …… 640

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

臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテーラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究

所 属 京都大学医学部附属病院 薬剤部

研究者 乾 賢一

臓器移植後のカルシニューリン阻害薬を中心とした免疫抑制療法の個別化を目的として、小腸及び肝組織を用いた遺伝子発現解析並びに遺伝子多型解析を実施し、得られた遺伝子情報を利用した投薬設計の構築を行うと共に、薬物動態変動機序の解明を目指した。

分担研究者

- (1) 京都大学医学部附属病院移植外科
高田泰次
- (2) 国立成育医療センター薬剤治療研究部
田上昭人
- (3) アステラス製薬(株)創薬推進研究所
加賀山彰

A. 研究目的

胆道閉鎖症など16歳未満の先天性疾患に限り保険適応であった生体肝移植治療は、平成16年1月からは16歳以上のウイルス性肝硬変に対しても保険適応となることが決定され、末期肝不全の根治的治療戦略として益々その需要が高まることが想定される。術後の免疫抑制療法は必須の薬物治療と位置づけられているが、過剰な免疫抑制は中枢毒性、腎毒性、高カリウム血症、高血糖及び骨粗鬆症などカルシニューリン阻害薬やステロイド剤に代表される免疫抑制剤の副作用発現が顕著になり、重篤な感染症の合併にも繋がる危険

性が高い。一方、過少免疫抑制ではいままでもなく移植肝に対する拒絶反応とそれに伴う肝機能低下が認められ、移植肝の脱落を引き起こす。これまで、有用な分子生物学的マーカーの不足から、術後の免疫抑制療法はカルシニューリン阻害薬の血中濃度モニタリング(TDM)と臨床情報に基づく調節を日々強いられてきた。

京都大学における生体部分肝移植治療は、平成17年末で累積1,157症例を数える。主任研究者はこれまで全ての症例に対し、免疫抑制剤の血中濃度モニタリングを中心とする術後管理の個別対応を行ってきた。また、平成13-15年度の創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業に参加することによって、移植術時の小腸P-糖タンパク質(Pgp、薬物トランスポータ)の発現レベルはFK506(タクロリムス)初期投与量設定に対し重要な薬物動態予測因子であること、移植肝CYP3A4(薬物代謝酵素)の発現レベル及びCYP3A5*3遺伝

子多型は、術後一定期間後のタクロリムス体内動態特性の個人差を説明するための分子生物学的指標となり得ることを見出した。本研究では、生体肝移植術時に採取される移植肝生検組織や小腸粘膜組織、さらに術後の末梢血白血球を用いた系統的な解析を実施し、タクロリムスの新しい作用機序解明とカルシニューリン阻害剤を中心とした適切な免疫抑制剤の選択法、個別化有効治療域設定法と個別化投与設計法の統合・確立を到達目標とした。計画第2年度である平成17年度では、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、移植肝組織片を用い、患者個々の小腸・肝臓P-糖蛋白質及びCYP3A4発現量を定量的に解析し、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。特に、拒絶反応及び生存率との関連について精査した。2) 小腸CYP3A5 mRNAの発現レベルを定量数値化し、*3多型との関連について調べた。3) 術後の末梢血白血球画分を抽出し、タクロリムスの薬理効果の指標として、カルシニューリン脱リン酸化活性を調べ、臨床情報との対応を精査した。抗リン酸化ペプチド抗体を用いた迅速且つ高感度なnon-RIカルシニューリン活性評価法の構築にも着手した。さらに、4) 脳血管内皮細胞特異的プロモーターの同定とそれを利用した脳のみP-糖タンパク質が発現する遺伝子導入マウス作成のための遺伝子コンストラクト作成と5) 臨床検体を用いたタクロリムス代謝物プロファイル作成と臨床症状の比較並びに新たにmTOR阻害薬シロリムスの測定系構築を行った。

B. 研究方法

(1) 対象被検者とインフォームド・コンセント

解析対象としては、京都大学において生体肝移植術の実施に同意した患者とした。また、被検者が15歳未満の小児の場合においては、本人の意思に加え両親等適切な代諾者による同意を得ることとした。また、本研究内容についての説明は、入院前に行われる移植治療そのものの説明に引き続いて約1時間かけて行われること、説明直後の署名捺印を求めず移植術当日朝に研究への協力意思の有無を説明医師に書面にて伝えること、署名捺印された同意書は京都大学医学部附属病院移植コーディネーター室に施錠の上厳重に保管されること、個人情報識別管理者は連結可能匿名化の上で本研究担当者に検体を受け渡すこと等を遵守した。なお、平成17年度では小腸検体59例、肝生検65例及び血液検体66例の採取と使用に同意を得ることができた。

(2) 倫理面への配慮

本研究は、ヘルシンキ宣言(1975年、東京総会で修正)を尊重し計画されたものであり、対象患者個人のプライバシーをはじめとする人権擁護の優先を念頭に実施した。なお、本研究計画の実施にあたり、血液及びヒト組織の一部を用いた免疫抑制剤の体内動態関連遺伝子並びに薬効発現関連遺伝子の発現変動と遺伝子多型解析は、平成13年6月12日に「免疫抑制剤の体内動態と薬効発現に関わる遺伝子群の探索に関する臨床研究」という題目で京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会より承認書が交付されており、上記趣

旨を逸脱することなくヒト組織の採取と使用を実施した。

(3) ヒト小腸組織、肝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、及び移植肝の病理学的検査を目的に採取される生検（ゼロバイオプシー）の一部を凍結した。凍結肝組織は、小腸組織と同様の手順によって溶解し、total RNA 画分の抽出を行った。さらに、肝ホモジネートの余剰分から、ゲノム DNA の抽出も行った。なお、total RNA の抽出は、ロシュ社 MagNAPure LC RNA II キットを、ゲノム DNA はロシュ社 MagNAPure LC DNA I キットを用いて行った。

(4) ヒト小腸組織に発現する P-糖タンパク質および CYP3A4 の定量

P-糖蛋白質をコードする MDR1 mRNA および CYP3A4 mRNA を同時定量した。遺伝子配列上極めて類似している CYP3A アイソフォーム（CYP3A4、5、7 及び 43）を分離評価可能なリアルタイム PCR 法を中心とした測定系によって実施した。

(5) 末梢血リンパ球を用いたタクロリムスの薬効解析

脱リン酸化酵素カルシニューリンの基質として知られる RII ペプチドを合成し、³²P 標識した後に、薬効測定に供した。余剰血液から末梢血単核球（PBMC）を分離した後に、³²P 標識 RII ペプチドとカルシウム・キレート剤である EGTA の存在、非存在下でインキュベーションを行った。カルシニューリン脱リン酸化活性は、カルシウムイオン依存性の ³²P 遊離速度として EGTA 有無の差をとることによって

評価した。

(6) 脳特異的に発現するヒト MDR1 遺伝子導入マウス作成

MDR1 欠損マウスに脳特異的 MDR1 発現マウスを作成するために脳特異的 MDR1 発現プラスミドの作成を行い、MDR1 欠損マウス由来受精卵に遺伝子導入し、トランスジェニックマウスの作成を行う。

(7) ヒト血液検体の前処理とタクロリムス及びその代謝物の測定

ヒト検体の前処理については、京都大学医学部附属病院内において内部標準物質を添加後、有機溶媒によって抽出し、加温真空装置による乾固の後、アステラス製薬株式会社創薬推進研究所へ送付することとした。なお、試料については、インフォームド・コンセント取得機関である京都大学医学部附属病院において匿名化することとした。

前処理サンプルを、API3000System (Applied Biosystem 社) を用いて定量分析した。定量限界はそれぞれ試料中濃度として 0.5 ng/mL であった。また、本方法を応用してシロリムス測定系の構築を行なった。

C. 研究成果

生体肝移植患者の小腸 MDR1 レベルとタクロリムス体内動態、臨床効果との比較解析

術時小腸 MDR1 mRNA レベルは、タクロリムス初期用量設定のための有用なバイオマーカーであること、さらに、術時の移植肝/患者体重比（GRWR）が初期用量の指標となることを確認した。また、術時の小腸 MDR1 mRNA レベルの中央値で患者群を 2 群に分けたところ、

High MDR1 群では Low MDR1 群の約 2 倍の頻度で拒絶反応を発症すること、術時の小腸 MDR1 レベルに応じた積極的な用量の増量が有効であることが推察された。さらに、拒絶反応を示した患者群では、Event-free 群と比較して有意に小腸 MDR1 mRNA レベルが高いこと、小腸 MDR1 レベルの高い患者群では死亡率も高いことも見いだした。従って、拒絶反応防御並びに移植肝の生着という面からも小腸 MDR1 レベルを参考にした初期投与量設定が、術直後の急性拒絶反応発現の予防に貢献できることが示唆された。

平成 17 年の 10 月以降について、本研究に協力の意思を示した患者すべてにおいて、タクロリムスの初期用量を小腸 MDR1 mRNA レベル並びに術前の予想 GRWR を参考に設定することにも同意を得ることができ、可能な限り分子情報を用いた用量設定を行っている。

遺伝子多型解析：小腸 CYP3A5 の mRNA レベルは、肝臓ほど高くないものの、MDR1 よりも高い発現プロファイルを示すこと、肝臓と同様に*3 多型（スプライシング異常）の影響を受けることが明確となった。次に、術後のタクロリムス血中濃度推移に対する CYP3A5 SNP の影響について調べた結果、CYP3A5 発現群（CYP3A5*1/*1 または*1/*3）は、CYP3A5 欠損群（*3/*3）と比較して高用量のタクロリムスが投与されていることが認められた。さらに、移植肝の CYP3A5 SNP との組み合わせを考慮した結果、移植肝及び患者小腸何れにも CYP3A5*1 が検出された患者群では、移植肝及び患者小腸の両方に CYP3A5 が欠損する群（*3/*3）と比較して、術後 35 日間を通して

タクロリムスの用量が高いこと、術後経過に従った用量漸増の傾きの高いことが判明し、術前検査におけるドナー及び患者の CYP3A5 SNP 解析は、肝移植後のタクロリムス体内動態の個人差を説明するための分子情報であることが示された。

末梢血検体を用いた解析：³²P 標識 RII ペプチドを用いたタクロリムスの薬効を定量的に評価した。臨床検体を用いて解析を行ったところ、タクロリムスによるヒト PBMC のカルシニューリン脱リン酸化活性抑制の EC50 値（最大効果の 50%を引き出すための血中濃度）は約 26ng/mL であった。一方、シクロスポリンの EC50 値は約 200ng/mL であった。さらに、シクロスポリン服用患者では、血中濃度が 600～700ng/mL でほぼ完全にカルシニューリン活性が押さえられることが判明した。一方、タクロリムス服用患者では、シクロスポリンほどカルシニューリン活性に変動幅がないこと、最大抑制効果も 60%程度であった。これらの結果を利用して、シクロスポリンの投与設計について検討を行ったところ、生体肝移植直後においては、一般的な 1 日 2 回投与よりも 1 日 1 回投与の方が腎毒性を回避できることなど有用であることが見いだされた。我々が作成した non-RI カルシニューリン活性測定系は、RI を用いたものと遜色ないレベルの感度を確保することが示された。

脳特異的な MDR1 発現マウスの作成：脳特異的な MDR1 発現ベクター作製のため、Slco1c1 および ICAP69 遺伝子のプロモーター領域のクローニングを行い、マウスの受精卵に注入を行った。

ヒト血液検体におけるタクロリムス及びその代謝物プロファイル: 37 症例、約 500 ポイントの検体を用いて、全血中未変化体タクロリムス並びに代謝物 M-I~M-III の LC/MS/MS による定量を行った。その結果、患者間における主代謝物は様々であること、それぞれの代謝物量は未変化体タクロリムス濃度に相関しないことが認められた。また、個々の症例について臨床経過との比較を行なったところ、急性拒絶反応の克服のために施行された高用量ステロイドパルス療法 (10mg/kg を静注) 後に血中 MI レベルの上昇する患者が存在することが分かった。一方、その他の代謝物については、現時点において臨床症状との明確な関連は見出されていない。

タクロリムス定量のための LC/MS/MS 法を応用して確立したシロリムス測定系は、良好な直線性を示した。また、既に京都大学において HPLC 法を用いて得られた膵島移植症例における測定結果と比較したところ、良好な対応関係を示すことが明らかとなった。

D. 考察

術時検体を用いた遺伝子解析: 肝臓移植時に切除される小腸組織及び術時肝生検の一部を用いた遺伝子発現解析の結果から、小腸 MDRI mRNA レベルはタクロリムスの初期投与量を設定する際の有用な分子情報であるだけでなく、術直後の拒絶反応防御のための重要なバイオマーカーとなりうる事が明確になった。また、移植肝 CYP3A5 SNP 解析に加えて、レシピエントの CYP3A5 多型を考慮に入れることによって、小腸や肝臓の CYP3A5

発現がタクロリムスのバイオアベイラビリティに少なくとも一部影響を及ぼすことが示され、小腸における CYP3A5 の役割が初めて明らかとなった。これらの結果は、ヒト組織を用いることによって定量的に明らかにできた成果であり、今後の個別化タクロリムス投与設計に役立つ情報を提供するものと考えられる。末梢血検体を用いた解析: タクロリムスによるカルシニューリン活性の抑制効果は、患者間において大きなばらつきがあること、臨床濃度域においてはカルシニューリン活性を完全に阻害し得ないことが判明した。一方、別のカルシニューリン阻害薬であるシクロスポリンについては、その血中濃度と薬効の良好な対応関係が得られた。

近年、シクロスポリンのマイクロエマルジョン製剤 (ネオーラル) が発売されて以来、シクロスポリンの血中濃度モニタリングは、従来のトラフ値 (C0) ではなく服用 2 時間後の値 (C2) を参考にすることがより個別化に有効であるという考えが、心臓移植や腎臓移植の領域で示されてきている。シクロスポリンの主要消失部位である肝臓を移植片として用いる肝移植治療の分野では、術直後の吸収動態が不安定であるために、C2 モニタリングの位置づけが不明確であった。カルシニューリン阻害効果をもとに、シクロスポリンの投与設計ならびに血中濃度モニタリングについて検討した結果、シクロスポリンによるカルシニューリン活性の最大抑制効果は、C2 値と良好に対応すること (逆相関)、一方、腎機能障害など副作用発現との関連は C2 値よりも C0 値と対応することが判明した。従って、拒絶

反応抑制の指標として C2 値の有用性が示されたが、副作用予防の指標とした C0 モニタリングは欠かせないことが示唆された。さらに、生体肝移植直後の患者に対しては、一般的な 1 日 2 回投与よりも 1 日 1 回投与の方がトラフ濃度の無意味な上昇を防ぐことができ、良好な臨床経過となる傾向が認められた。従って、タクロリムスを中心とした免疫抑制療法では安定しない症例に対しては、1 日 1 回のシクロスポリン投与という選択肢を提供することができた。すなわち、副作用などが原因でタクロリムスからシクロスポリンに主たる免疫抑制剤を変更せざるを得ない症例や、原発性胆汁性肝硬変などシクロスポリンを使用することによって原疾患の再発頻度が有意に低い症例に対して、ネオオーラルを使用する際の有用な臨床情報を提供するものと考えられる。

脳特異的 MDR1 発現マウスの作成: 今回獲得したプロモーター領域をもちいて GFP を発現させたところ発現が確認されたが、MDR1 遺伝子の発現は微弱であった。この脳特異的発現 MDR1 コンストラクトでトランスジェニックマウス作成後発現量を確認し、発現が十分でない場合は他のプロモーターを用いた発現プラスミドを作成する必要があると考えられる。

タクロリムス代謝物プロファイル作成:

未変化体タクロリムスを含め、代謝物の血中濃度は患者間での大きな差違が見出された。京都大学の小腸移植症例において、高用量ステロイドパルス療法 (10mg/kg を静注) 後に小腸の CYP3A4 の発現レベルは速やかに 10 倍程度にまで上昇 (誘導) されることが示さ

れている。今回調べた症例の中には、ステロイドパルス療法後に血中 M1 レベルが上昇する場合が散見された。これらは、ステロイドによって肝 CYP3A4 の発現並びに活性が誘導され、代謝物生成量の増大につながったと考えられる。今後、解析症例をさらに積み重ね、他の代謝物血中濃度の臨床的意義について明らかにする予定である。

我々が開発した LC/MS/MS シロリムス血中濃度測定系は、従来の HPLC 法と良好な対応を示しただけでなく、高感度化にも成功した。高精度かつ高感度な測定系は採血量の減量につながることから、患者に対する負担を軽減できるという利点を有する。小児例の場合、採血量が限られることから、本測定系の高感度という利点を発揮したと考える。シロリムスは現在、本邦において未承認薬であるが他の免疫抑制剤が奏功しない難治性の拒絶反応に対する数少ない選択肢の一つと考えられる。従って、シロリムスの高感度測定系の確立は、原因不明の拒絶反応に対するシロリムスの適正使用に貢献するだけでなく、日本人における貴重な臨床データの収集という側面からも意義深いと考える。

E. 結論

平成 17 年度では、肝臓移植時に得られるヒト組織を用いた遺伝子情報の術後管理への有用性について、明確にすることが出来た。さらに、遺伝子多型情報の有用性、PBMC を用いた薬効評価による個々の免疫抑制剤の特徴について詳細に理解することが出来た。さらに、タクロリムスの代謝物プロファイルには大き

な個人差が存在すること、一部高用量ステロイド投与による影響も観察できた。同時に進めた遺伝子改変動物作成のための遺伝子コンストラクト作成とマウス受精卵への注入を終えた。

F. 成果発表

1. 論文発表

- 1) Fukatsu S, Fukudo M, Masuda S, Yano I, Katsura T, Ogura Y, Oike F, Takada Y, and Inui K, Delayed effect of grapefruit juice on pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in a living-donor liver transplant recipient. *Drug Metab Pharmacokinet* 21 (2): 122-125 (2006).
- 2) Fukudo M, Yano I, Masuda S, Katsura T, Ogura Y, Oike F, Takada Y, Tanaka K and Inui K, Cyclosporine exposure and calcineurin phosphatase activity in living-donor liver transplant patients: twice daily versus once daily dosing. *Liver Transpl* 12 (2):292-300 (2006).
- 3) Masuda S, Goto M, Fukatsu S, Uesugi M, Ogura Y, Oike F, Kiuchi T, Takada Y, Tanaka K and Inui K, Intestinal MDR1/ABCBI Level at Surgery As a Risk Factor of Acute Cellular Rejection in Living-donor Liver Transplant Patients. *Clin Pharmacol Ther* 79 (1) 90-102 (2006).
- 4) Uesugi M, Masuda S, Katsura T, Oike F, Takada Y and Inui K, Effect of intestinal CYP3A5 on postoperative tacrolimus trough levels in living-donor liver transplant

recipients. *Pharmacogenet Genomics* 16 (2) 119-127 (2006).

- 5) Omae, T., Goto, M., Shimomura, M., Masuda, S., K., I., Okuda, M., and Inui, K., Transient up-regulation of P-glycoprotein reduces tacrolimus absorption after ischemia-reperfusion injury in rat ileum. *Biochem Pharmacol* 69 (4) 560-567 (2005)
- 6) Fukudo, M., Yano, I., Masuda, S., Okuda, M., and Inui, K., Distinct inhibitory effects of tacrolimus and cyclosporin A on calcineurin phosphatase activity. *J Pharmacol Exp Ther* 312 (2) 816-825 (2005)

2. 学会発表

1) 国際学会

- (1) Fukudo M, Yano I, Masuda S, Katsura T, Oike F, Takada Y, Tanaka K, Inui K: Improved immunosuppression by once daily dosing of cyclosporine in living-donor liver transplantatin, 第20回日本薬物動態学会 (JSSX) と第13回国際薬物動態学会 (ISSX) のジョイントミーティング (平成 17 年 10 月 22-27 日、米国、ハワイ、マウイ島、Wailea Marriott Resort)
- (2) K. Inui: Clinical implication of Drug transporters, BioMedical Transporters 2005 (8月14-18日、Olma Congress Center, St. Gallen, Switzerland) (招聘講演)

2) 国内学会

- (1) 上杉美和、増田智先、桂 敏也、尾池文隆、高田泰次、乾 賢一：生体肝移植後のタクロリムス血中濃度推移に対する小腸 CYP3A5 の役割、第 26 回日本臨床薬理学会、(平成 17 年 12 月 1-3 日、大分県別府市)
- (2) 増田智先、後藤真樹、深津祥雄、上杉美和、尾池文隆、高田泰次、乾 賢一：生体肝移植後の急性拒絶反応危険因子としての小腸 P-糖タンパク質発現レベルの評価、第 26 回日本臨床薬理学会、(平成 17 年 12 月 1-3 日、大分県別府市)
- (3) 福土将秀、増田智先、矢野育子、桂 敏也、尾池文隆、高田泰次、乾 賢一：生体肝移植患者におけるシクロスポリン 1 日 1 回当四時の体内動態と薬効特性、第 26 回日本臨床薬理学会、(平成 17 年 12 月 1-3 日、大分県別府市)
- (4) 増田智先、乾 賢一：肝移植後のタクロリムス体内動態の個体差予測と用量設定、第 21 回日本 DDS 学会、ワークショップ 5「オーダーメイド医療」(招聘講演)(平成 17 年 7 月 22-23 日、長崎市)
- (5) 佐藤栄里子、下村昌寛、増田智先、矢野育子、土生康司、桂 敏也、松本慎一、興津 輝、岩永康裕、野口洋文、永田英生、米川幸秀、田中紘一、乾 賢一：臍島移植患者におけるラパマイシンの体内動態と薬効・副作用に関する検討、第 22 回日本 TDM 学会・学術大会(平成 17 年 5 月 21-22 日、沖縄県宜野湾市)
- (6) 乾 賢一：薬物トランスポータと TDM 研究、第 22 回日本 TDM 学会・学術大会、特別講演(平成 17 年 5 月 21-22 日、沖縄県宜野湾市)
- (7) 乾 賢一：薬剤師が変える薬物治療：薬学教育 6 年制に應えるために、第 60 回医薬品相互作用研究会シンポジウム 30 周年記念式典(平成 17 年 7 月 23 日、仙台国際センター、特別講演)
- (8) 大澤理代、佐藤栄里子、増田智先、若杉博子、矢野育子、松本慎一、福田一仁、山田祐一郎、稲垣暢也、乾 賢一：京大病院薬剤部における臍島移植に対する取り組み、第 16 回日本医療薬学会年会、一般ポスター発表(平成 17 年 10 月 1-2 日、岡山)
- (9) 増田智先、矢野育子、乾 賢一：臍島移植患者における免疫抑制剤の TDM、第 16 回日本医療薬学会年会、シンポジウム(招聘講演)(平成 17 年 10 月 1-2 日、岡山コンベンションセンター)
- (10) 乾 賢一：21 世紀における薬剤師の役割、学術会議講演会(社会のニーズに應える薬剤師育成と医薬連携のあり方)(基調講演)(2 月 24 日、日本学術会議講堂)
- (11) 乾 賢一：薬物動態制御機構の解明と臨床応用に関する研究 (Clarification of Pharmacokinetic Regulatory Factors and Their Clinical Applications) 平成 18 年度日本薬学会

賞受賞講演（3月28日、日本薬学会

第128年会、仙台）

G. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得 なし
- 2) 実用新案登録 なし
- 3) その他 なし

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

平成18年7月31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