

図 4 0 情報がある場合に添付文書の薬物動態欄に記載するもの

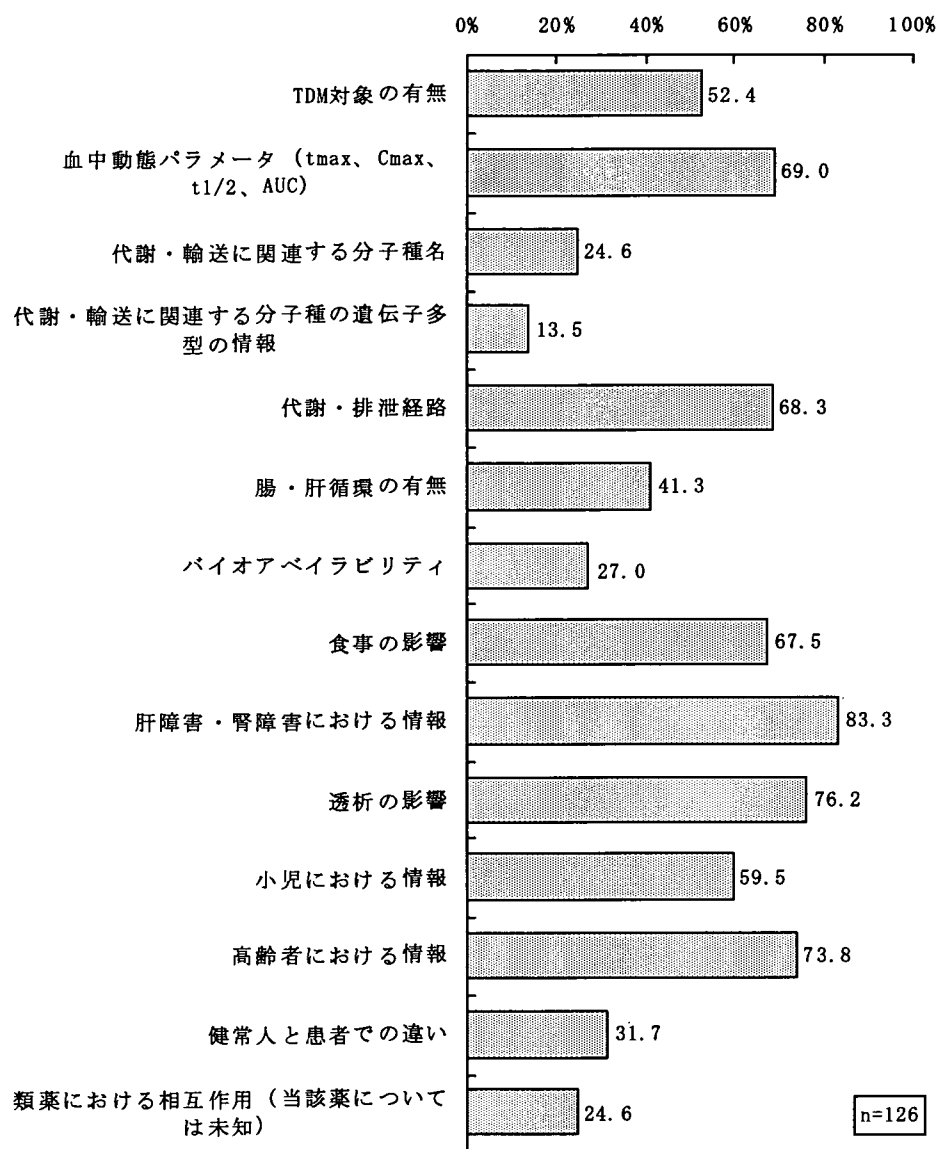


図4 1 ファーマコゲノミクス情報がある場合の情報提供

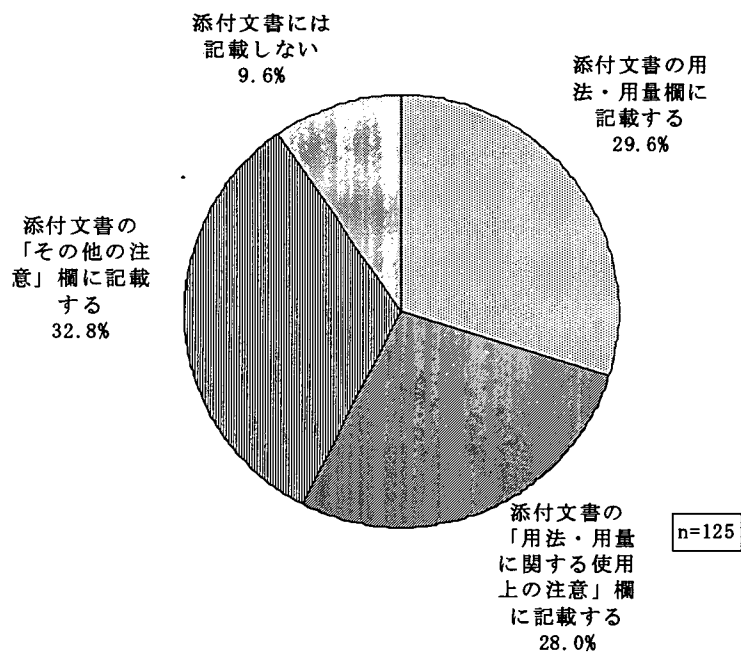


図4 2 文献や学会発表、臨床報告での副作用や相互作用の報告の反映状況

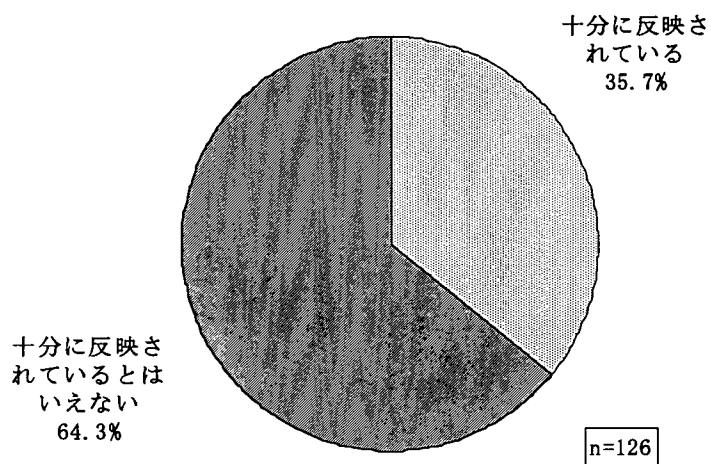


表-1 向精神・神経薬と他剤との併用で有害事象が発症した報告 (18+13 症例)

Target Drug	Effectors	Enhanced or Adverse Effects
Carbamazepine (CBZ)	Lopinavir/ritonavir Lopinavir/nelfinavir	BL↑、過度の眠気、不安定歩行
Carbamazepine	Oxybutynin, Dantrolene	BL↑、CBZ 中毒
Carbamazepine	Terbinafine	BL↑、CBZ 中毒
Citalopram	Rifampin	パニック発作再発
Citalopram	Fentanyl	セロトニン症候群
Fluvoxamine	Oxycodone	重篤なセロトニン活動性症状
Fluoxetine	Linezolid	セロトニン症候群
Venlafaxine	Litium	BL↑、セロトニン症
Duloxetine	Cyclobenzapine	重度のセロトニン症候群
Atomoxetine	Clonidine, Dextroamphetamine	精神病、異常無意識行動、不眠
Atomoxetine	Venlafaxine	顔面痙攣、振戦、言語障害
Phenelzine	Cyclobenzapine	重度のセロトニン症候群
Valproic acid	Ritonavir	BL↓、躁病悪化
Valproic acid	Cisplatin	BL↓、重篤な全身性強直間代性発作
Valproic acid	Meropenem	BL↓、全身性強直間代性発作
Olanzapine	Fluvoxamine	過流涎
Tramadol	Meperidine	視覚幻覚・方向感覚失墜
Quetiapine	Valproic acid	BL↑、強度の筋失調症

6種のセロトニンアゴニストと linezolid (MAO 阻害薬) との併用投与で発症したセロトニン症候群の 13 症例報告の解析

表-2 抗凝固薬が他剤との併用で有害事象を発症した報告 (21 症例)

Target Drug	Effectors	Adverse Events
Warfarin	Leflunomide	INR 延長
Warfarin	Chamomilla	多発性内出血
Warfarin	Trimethoprim, Cephalexin, Metronidazole	後腹膜血腫
Warfarin	Clarithromycin	後腹膜血腫
Warfarin	Amoxicillin/Clavulanate	腹直筋鞘血腫
Warfarin	Capecitabine	結膜下出血、鼻出血
Warfarin	Capecitabine	INR 延長、出血性膨れ、斑状出血
Warfarin	Capecitabine	Warfarin 減量
Warfarin	5-Fluorouracil	鼻血、血便
Warfarin	5-Fluorouracil	後腹膜血腫 (2 症例)
Warfarin	Phenytoin の投与中止	INR 延長、出血
Warfarin	Simvastatin	INR 延長、左脳出血死
Warfarin	Doxycycline	INR 延長、斑状出血
Warfarin	Levofloxacin	心膜血腫、後腹膜血腫 (3 症例)
Acenocoumarol	Rosuvastatin	INR 延長、足に血腫
Acenocoumarol	Rifampicin	INR 短縮
Fluidione	Paracetamol	皮膚血腫、歯肉血腫
Fluidione	Paracetamol	INR 延長
Warfarin	Nafcillin	Warfarin 増量

2000年4月-2002年6月までの4,600万人の患者について調査で、warfarinとNSAIDの併用患者数及びその副作用発現率が併用薬組合せのうちで最大

表-3 心・血管系薬が他剤との併用で有害事象を発症した報告（8 症例）

Target Drug	Effectors	Adverse Events
Tizanidine	Rofecoxib	重篤な洞性徐脈
Tizanidine	Ciprofloxacin	心拍、血圧、体温低下
Nifedipine	Clarithromycin	血管拡張ショック
Verapamil	Telithromycin	低血圧、徐脈性不整脈
Tadalafil	Itraconazole	持続勃起症
Metoprolol	Propoxyphene	致死性徐脈
Amiodarone	Metronidazole	torsades de pointes
Pilsicainide	Cetirizine	失神状態、徐脈を伴った不整脈

9 人の健常人試験で、tizanidine の血圧低下及び鎮静作用は rofecoxib との併用で著しく増大し、口内乾燥症及び疲労の誘発。Tizanidine の AUC が 14 倍に増加

表-4 コレステロール低下薬が他剤との併用で筋毒性を発症した報告（6 症例）

Target Drug	Effectors	Adverse Events
Simvastatin	Amiodarone	横紋筋融解症、腎障害、肝障害
Simvastatin	Clarithromycin、Amiodarone	筋衰弱
Simvastatin	Atazanavir	横紋筋融解症、急性腎障害
Simvastatin	Cyclosporine	横紋筋融解症
Pravastatin	Colchicine	筋症
Ezetimibe	Atorvastatin	CK ↑、筋肉痛

表-5 Digoxin と他剤との併用による digoxin 中毒を発症した報告（6 症例）

Target Drug	Effectors	Adverse Events
Digoxin	Clarithromycin	BL ↑、digoxin 中毒（3 症例）
Digoxin	Clarithromycin	BL ↑、digoxin 中毒（2 症例）
Digoxin	Omeprazole	Digoxin 中毒

Digoxin を投与された 245,305 人のうち、3,144 件で digoxin 中毒が発現し、併用投与によるリスクとして paroxetine のオッズ比が 2.8、fluoxetine が 2.9、sertraline が 3.0、fluvoxamine が 3.0、三環系抗うつ薬が 1.5、benzodiazepines が 2.1

表-6 HIV 薬剤の有害事象が protease inhibitors との併用により発症した報告（6 症例）

Target Drug	Effectors	Adverse Events
Vinblastine	Ritonavir/lopinavir	重篤な消化管毒性、血液毒性、中等度の腎障害
Carmabazepine	Ritonavir/lopinavir	BL ↑、過度の眠気、不安定歩行
Fluticasone	Ritonavir/lopinavir	BL ↑、副腎機能抑制作用
Fluticasone	Atazanavir/ritonavir	BL ↑、クッシング症候群、副腎抑制
Rifabutin	Ritonavir	前房蓄膿性ブドウ膜炎
Levothyroxine	Ritonavir/lopinavir	甲状腺機能低下症

表-7 2つの併用薬の相互作用による有害事象が発症した報告（5症例）

Target Drug-1	Target Drug-2	Adverse Events
IFN alpha 2b	Gemfibrozil	重篤な消化管障害、肝酵素の上昇
IFN alpha 2b	Gemfibrozil	肝炎
Gemcitabine	Erlotinib	ざ瘡性皮膚毒性、重篤な間質性肺疾患
Risperidone	Methylphenidate	急性の一時性運動障害
Disulfiram	Methylphenidate	精神病症状が発症

表-8 その他の併用で相互作用による有害事象が発症した報告（8症例）

Target Drug	Effectors	Adverse Events
Cyclophosphamide	Roxithromycin	肝内静脈閉塞病
Cyclosporine	Oxcarbazepine	血中濃度が期待値以下に減少
Oxycodone	Rifampin	鎮痛作用の喪失
Linezolid	Rifampin	殺菌作用の喪失
Levothyroxine	Raloxifene	甲状腺機能低下様の症状
Dextromethorphan	Methadone	幻覚症状、過睡眠、錯乱、無気力、集中力欠如、食欲不振
Didanosine	Valganciclovir	CD+細胞数の減少
Baclofen	Propofol	（Baclofen 無投与で）重篤な発作
Varenicline	Amphetamine	喫煙の再開

分担研究報告書

抗がん剤併用療法における有害事象発生例の調査・分析に関する研究

分担研究者	山本弘史	国立がんセンター中央病院薬剤部
	北條泰輔	国立がんセンター中央病院薬剤部
研究協力者	米村雅人	国立がんセンター中央病院薬剤部
	矢内貴子	国立がんセンター中央病院薬剤部
	渡部大介	国立がんセンター中央病院薬剤部
	清水千佳子	国立がんセンター中央病院乳腺・腫瘍内科
	藤原康弘	国立がんセンター中央病院乳腺・腫瘍内科

研究要旨：トラスツズマブは時に重篤な心障害、Infusion reaction（IR）を起こす。この副作用に対する予測やモニタリングは薬物治療を行う上で重要である。国立がんセンター中央病院における診療録調査を通じ、乳がんを使用されるトラスツズマブの前治療歴の有無や抗がん剤併用時における関連性を明らかにし、心障害、Infusion reactionの予測可能性を検討した。

A 研究目的

乳がんでは多剤併用療法の有用性が確立され、標準治療レジメンとして、不可逆的な心毒性を有するアンスラサイクリン含有レジメン及びタキサン系レジメンが中心的な役割を担っている。また悪性度が高く予後不良とされる乳がん細胞の膜蛋白である HER2 蛋白陽性患者においては、上記レジメンに加えたトラスツズマブの投与が標準治療とされている。トラスツズマブは時に重篤な心障害、Infusion Reaction (IR) を起こす。この副作用に対する予測やモニタリングは薬物治療を行う上で重要である。国立がんセンター中央病院における診療録調査を通じ、トラスツズマブの代表的な副作用である心障害及び Infusion Reaction (IR) の発生状況に関する調査を行い、抗がん剤治療歴や抗がん剤併用時等のリスクファクターを有する場合での心毒性、IR の発生状況を明らかにし、より安全な薬物治療に資することを目的とした。

B 研究方法

国立がんセンター中央病院におけるトラスツズマブ投与歴を有する乳がん患者に対し、診療録及びオーダリングシステムを用い調査した。対象は、本薬剤が承認された 2001 年 6 月から 2006 年 12 月の間で診療録を用い抽出したトラスツズマブ投与歴を有する乳がん患者 321 名のうち、初回治療を当院にて施行した患者 313 名を対象とした。調査項目は、患者背景（年齢、身長、体重、既往歴、HER2 発現及びホルモン受容体発現等）、アンスラサイクリン系抗がん剤（Anth 系）及び胸部放射線前治療歴、抗がん剤投与状況に関連した心障害、IR の発現状況とした。心毒性及び IR 発現に影響を及ぼす関連因子を単変量、多変量解析にて評価した。心毒性発現の関連因子は Cox 比例ハザードモデルを用いて単変量解析を行い、関連性が推定された因子を用い多変量解析を行い評価した。また IR 発現の関連因子はロジスティック重回帰モデルを用いて評価した。

個人情報取り扱いは、「がんセンター保有個人情報管理規定」及び「国立がんセンターが扱う個人情報に関するガイドライン」に従った。

## C 研究結果

患者背景として年齢及びBMI (mean±SD) は、それぞれ (54.7±10.6 才) 及び (22.4±3.3kg/m<sup>2</sup>) であった (表 1、2)。心障害発現症例 (表 3) は 16 名 (5.1%) であり、IR (表 4) は 92 名 (29.4%) であった。心障害関連因子 (表 5) では、単変量解析にて心疾患既往歴あり (相対ハザード比、95%CI、有意確率: 8.556、2.412-30.357、P=0.001)、遠隔転移あり (9.612、1.262-73.218、P=0.100)、手術歴あり (5.393、1.215-23.933、P=0.027) の 3 因子の関連性が推定され、さらにこれらの因子に関し多変量解析を行い、心疾患既往歴あり (オッズ比、95%CI、有意確率: 6.027、1.270-5.100、P=0.006) が独立して心障害発現と関連していることが推定された。また IR に影響を及ぼす関連因子 (表 6) では、ロジスティック重回帰モデルを用い解析した結果、抗がん剤治療歴あり (オッズ比、有意確率: 2.550、0.008) が他の要因と独立して発現に関与していることが推定された。

## D 考察

トラスツズマブ投与における心障害は、メーカー報告とは差があったものの前治療歴や併用薬剤の差異には違いが無かった。トラスツズマブ投与の安全性が高いと思われる反面、心障害例数が少なく更なる検討が必要と思われる。今後は、承認拡大による術前・術後療法におけるトラスツズマブの使用頻度が増すことが予測されており、心障害のモニタリングは重要である。

IR の発現率は約 30% であり、患者への十分な説明が必要と思われる。トラスツズマブ投与時の IR において Anth 系抗がん剤の前治療歴無し群は、有り群と比べ発生割合は多かった。さらにステロイド剤前投薬が IR 発生割合を軽減すると思われ、IR 発現の予測が可能であれば、IR リスクの高い患者には IR 予防法としてステロイド剤の前投薬の選択も一案と考えられた。

トラスツズマブ投与による心障害発現関連因子として、心疾患既往歴が推定された。当薬剤による心保護作用の抑制が示唆されており、既往があることにより心障害リスクが高まることが考えられた。IR 発現と抗がん剤治療歴の関連性は、臨床的にも知見はなく今後の詳細な検討が必要である。これら重篤な副作用の発現を関連因子より予測し、薬剤管理指導における副作用モニタリングとして着目することで、早期治療へとつながる。特に複数の抗がん剤を併用していくがん治療においては、重要な情報となりうる。

## E. 結論

現在、がん薬物療法は急速に進展しつつあり、乳がんでは本研究で解析した分子標的薬であるトラスツズマブが使用されている。大腸がんでも分子標的薬ベバシズマブを含むレジメンが登場している。有害事象の発生頻度を把握し提供することで症状を早期に発見し、適切な支持療法を組み合わせることより安全ながん薬物療法が提供できると考える。しかし、新規レジメンの場合有害事象に関する詳細な情報が得られることは難しく、各薬剤の添付文書や IF の副作用発生率を利用することになる。本研究の結果は現在解析中であるが、日常診療と添付文書・IF 双方の有害事象発生率の比較検討した結果をもとに薬剤管理指導業務に反映させ、より安全ながん薬物治療に貢献したい。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

矢内貴子、米村雅人、渡部大介、清水千佳子、村越功治、加藤裕久、藤原康弘、北條泰輔

「トラスツズマブの心障害と Infusion reaction  
に及ぼす影響」 第17回日本医療薬学会年会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



抗がん剤投与方法の詳細

<b>HCN単独</b>		<b>HCN(60分)</b>
<b>HCN + PTX</b>	●●●●●●●●●●●●●●●●	HCN(60分)⇒pre med①⇒PTX(60分)
<b>HCN + DTX</b>	■ ■ ■ ■	HCN(60分)⇒pre med②⇒DTX(60分)
<b>HCN + VNR</b>	●● ●● ●● ●●	VNR(i.v.)⇒HCN(60分)
<p>=トラスツズマブ(HCN) 4mg/kg (負荷投与) + 2 mg/kg/(維持用量) 300mg/body or 150mg/body</p> <p>●●●●●●●●●●●●●●●● = パクリタキセル(PTX) 80 mg/m<sup>2</sup> 毎週投与 x 12</p> <p>■ ■ ■ ■ = ドセタキセル(DTX) 80 mg/m<sup>2</sup> 3週1回 x 4~8</p> <p>● ● ● ● = ビノレルピン(VNR) 25 mg/m<sup>2</sup> 2投1休</p> <p>pre med①: デキサメタゾン8mg+ラニチジン50mg、シフェンヒドラミン10mg</p> <p>pre med②: デキサメタゾン8mg</p>		

表1 患者背景

	平均±標準偏差
年齢(歳)	54.7±10.6
身長(cm)	154.6±5.9
体重(kg)	53.5±8.4
BMI	22.4±3.3

表 2 調査因子

因子		症例数 (n=313)	%
性別	女	311	99.4
	男	2	0.6
心疾患	+	11	3.5
	-	302	96.5
肺疾患	+	297	94.9
	-	16	5.1
高血圧	+	36	11.5
	-	277	88.5
糖尿病	+	10	3.2
	-	303	96.8
喫煙歴	+	46	14.7
	-	242	77.3
	不明	25	8
飲酒歴	+	83	26.5
	-	205	65.5
	不明	25	8
食物アレルギー	+	18	5.8
	-	289	92.3
	不明	6	1.9
薬物アレルギー	+	42	13.4
	-	266	85
	不明	5	1.6
遠隔転移	+	194	62
	-	119	38
リンパ節転移	+	115	36.7
	-	198	63.3
手術歴	+	177	56.5
	-	136	43.4
胸部放射線治療歴	+	72	23
	-	241	77
ER 発現	+	98	31.3
	-	213	68.1
	不明	2	0.6

	+	82	26.1
PgR 発現	-	229	73.1
	不明	2	0.8
アンスラサイクリン系	+	199	63.6
薬剤既治療歴	-	114	36.4
	+	132	42.2
ホルモン製剤既治療歴	-	181	57.8

表 3 心障害発現割合

心障害	症例数(n=313)	%
+	16	5.1
-	297	94.9

表 4 Infusion Reaction (IR) 発現割合

IR	症例数(n=313)	%
+	92	29.4
-	221	70.6

表 5 心障害に影響を及ぼす関連要因

因子	単変量解析			多変量解析		
	相対ハザード比 (95%信頼区間)	有意確率		相対ハザード比 (95%信頼区間)	有意確率	
年齢	1.018	(0.971-1.068)	0.452	-	-	-
BMI	1.017	(0.870-1.189)	0.834	-	-	-
心疾患	8.556	(2.412-30.357)	0.001	6.027	(1.666-21.806)	0.006
肺疾患	1.644	(0.216-12.508)	0.631	-	-	-
高血圧	0.502	(0.066-3.818)	0.506	-	-	-
糖尿病	1.959	(0.257-14.917)	0.516	-	-	-
喫煙歴	0.818	(0.185-3.628)	0.792	-	-	-
飲酒歴	0.360	(0.081-1.594)	0.178	-	-	-
遠隔転移	9.612	(1.262-73.218)	0.029	5.983	(0.708-50.552)	0.100
リンパ節転移・再発	1.474	(0.534-4.066)	0.454	-	-	-
手術歴	5.393	(1.215-23.933)	0.027	2.338	(0.477-11.450)	0.295
胸部放射線治療歴	0.896	(0.253-3.179)	0.865	-	-	-
ER発現	1.198	(0.419-3.507)	0.742	-	-	-
PgR発現	0.733	(0.207-2.598)	0.630	-	-	-
アンスラサイクリン系薬剤既治療歴	2.449	(0.691-8.683)	0.165	-	-	-
ホルモン製剤既治療歴	1.332	(0.482-3.677)	0.580	-	-	-

表 6 Infusion Reaction に影響を及ぼす関連要因表 1 患者背景

因子	オッズ比 (95%信頼区間)		有意確率
年齢	0.979	(0.951-1.008)	0.150
BMI	1.006	(0.925-1.093)	0.895
心疾患	0.953	(0.223-4.074)	0.948
肺疾患	1.212	(0.311-4.728)	0.782
高血圧	1.927	(0.827-4.490)	0.129
糖尿病	0.979	(0.223-4.296)	0.978
喫煙歴	1.004	(0.476-2.116)	0.992
飲酒歴	1.116	(0.599-2.079)	0.730
食物アレルギー	0.858	(0.250-2.945)	0.808
薬物アレルギー	0.640	(0.268-1.528)	0.315
遠隔転移	1.047	(0.484-2.264)	0.908
リンパ節転移・再発	1.194	(0.634-2.251)	0.583
手術歴	1.343	(0.623-2.897)	0.452
胸部放射線治療歴	1.252	(0.642-2.442)	0.510
ER発現	0.699	(0.332-1.472)	0.346
PgR発現	0.650	(0.291-1.452)	0.293
ホルモン製剤既治療歴	1.000	(0.507-1.974)	1.000
抗がん剤既治療歴	2.550	(1.270-5.100)	0.008

医薬品の薬物輸送の評価系確立に関する研究

分担研究者 杉山 雄一 東京大学大学院薬学系研究科 教授

**研究要旨** トランスポーターの発現誘導による薬物間相互作用として、一部の NSAIDs が PPAR $\alpha$  のアゴニストになることに注目して研究を行った。合成 PPAR $\alpha$  アゴニスト (WY14643) と ibuprofen をマウスに前投与 (3日間) したところ、経口投与後の methotrexate の血漿中濃度 AUC が、それぞれ非投与群の 5、1.4 倍に増加した。静脈内投与では血漿中濃度の AUC の増加は、WY14643 処理群で 1.4 倍程度であった。これらの結果は、WY14643 による効果は消化管吸収の促進によるものと考えられた。PPAR $\alpha$  アゴニスト処理によるトランスポーターの発現変動を realtime PCR 法を用いて定量した。PPAR $\alpha$  アゴニスト投与群においても、methotrexate の消化管吸収に関わるトランスポーターである PCFT、RFC、Mrp3、排出に働く Mrp2 の mRNA レベルは非投与群と同程度であり、変動は見られなかった。PPAR $\alpha$  による発現誘導が methotrexate と NSAIDs との薬物間相互作用メカニズムの一つとなる可能性が示唆された。蛋白レベルでの制御あるいは他のトランスポーターによる関与が考えられる。

**A. 研究目的**

複数の医薬品が併用される現在の薬物療法では、安全性確保のために薬物間相互作用が生じないことを確認することは必須である。本研究では、トランスポーターが関与する組織移行性・排出過程における薬物間相互作用に注目し、そのメカニズムを解明することで、in vitro で定量的に評価するための試験系を確立することを目的とした。

NSAIDs により methotrexate の血液中からの消失が遅延し、重篤な副作用が生じたことが過去報告されている。この相互作用のメカニズムとして、H17、18 年度にヒト腎組織を用いた取り込み過程の評価法を立ち上げ、必ずしも全ての NSAIDs との相互作用を説明できないものの、臨床投与量での非結合型薬物濃度で取り込み過程の阻害が生じることを報告した。さらに、methotrexate の細胞内からの排出に働くことが予想されるトランスポーターとして、ABC トランスポーター MRP2、MRP4、BCRP に対する NSAIDs とそのグルクロン酸抱合体による阻害実験を行い、やはり一部の NSAIDs は特に MRP4 を強く阻害することを報告している。

本研究では、一部の NSAIDs が PPAR $\alpha$  のリガンドになることに注目し、合成 PPAR $\alpha$  リガンドと ibuprofen をマウスに投与し、methotrexate の体内動態 (特に吸収過程) に与える影響を検討した。

**B. 研究方法**

FVB マウス (雄性、10 週齢) に、合成 PPAR $\alpha$  リガンド (WY14643) と ibuprofen を食餌に混ぜ (それぞれ 0.05、0.04%)、3 日後に、methotrexate を経口投与し、血液中濃度を測定した。野生型マウスならびに Mrp3 ノックアウトマウスを用いた比較を行った。PPAR $\alpha$  リガンド処理によるトランスポーターの発現変動を realtime PCR 法を用いて定量した。

**C. 研究結果**

WY14643 と ibuprofen 投与群では、経口投与後の methotrexate の血漿中濃度 AUC が、それぞれ非投与群の 5、1.4 倍に増加した。静脈内投与では血漿中濃度の AUC の増加は、WY14643 処理群で 1.4 倍程度であった。Mrp3KO でも、同程度の血漿中濃度の増加が観察された。

PPAR $\alpha$  により正に制御されている Fatty Acid Translocase の小腸での発現は、十二指腸、空腸、回腸のいずれのセグメントでも PPAR $\alpha$  リガンド処理により顕著に増加していた。しかし、methotrexate の消化管吸収に関わるトランスポーターである PCFT、RFC、Mrp3 の mRNA レベルは非投与群と同程度であり、methotrexate の排出に働くと考えられる Mrp2 の mRNA 発現にも変動は見られなかった。

**D. 考察**

合成 PPAR $\alpha$  リガンドならびに ibuprofen の繰り返し投与により、methotrexate の血液

中濃度が増加することから、NSAIDs との薬物間相互作用に PPAR $\alpha$  を介した発現制御が含まれていることが示唆された。静脈内投与、経口投与後の体内動態の比較から、この作用は消化管吸収の増加によるものと考えられた。しかし、PPAR $\alpha$  による制御を受けている Fatty Acid Translocase mRNA の発現は増加したものの、Mrp3 も含めて methotrexate の消化管吸収過程に働くトランスポーターの mRNA 発現は PPAR $\alpha$  リガンドの影響はうけなかったことから、この血液中濃度の増加にはこれらトランスポーター以外の関与、あるいは non-genomic な作用が考えられる。

#### E. 結論

PPAR $\alpha$  による発現誘導が methotrexate と NSAIDs との薬物間相互作用メカニズムの一つとなる可能性が示唆された。分子メカニズムの同定にはさらなる検討を必要とする。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. Nozaki Y, Kusahara H, Kondo T, Iwaki M, Shiroyanagi Y, Nakayama H, Horita S, Nakazawa H, Okano T, Sugiyama Y. Species difference in the inhibitory effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the uptake of methotrexate by human kidney slices. *J Pharmacol Exp Ther.* 322:1162-70, 2007
2. Matsushima S, Maeda K, Ishiguro N, Igarashi T, Sugiyama Y. Investigation of the inhibitory effects of various drugs on the hepatic uptake of fexofenadine in humans. *Drug Metab Dispos, in press.*

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

医薬品の薬物動態相互作用の評価系確立に関する研究

分担研究者 頭金 正博 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 第二室長

研究要旨： 医薬品の相互作用に影響を及ぼす P-糖タンパク質(P-gp)の誘導現象を評価するための *in vitro* アッセイを構築することを目的とした。小腸由来のヒト Caco-2 細胞に、核内受容体の VDR と RXR $\alpha$  を共発現させ、P-gp 遺伝子 (*MDR1*) のプロモーター領域を組み込んだレポーター遺伝子を用いて転写活性を測定した。その結果、*MDR1* の 8 Kbp 上流付近に VDR/RXR $\alpha$  による誘導に必須の領域が存在することが明らかとなり、この遺伝子領域を用いることによって P-gp の誘導能を持った *in vitro* アッセイ系を構築することが可能になった。

A. 研究目的

臨床においては複数の医薬品が同時に処方される場合が多く、それぞれの医薬品について薬物代謝酵素や薬物トランスポーターなどの誘導に関する情報を提供することは、医薬品による相互作用を防止する上で重要である。薬物代謝酵素の誘導に関しては、核内受容体の関与が明らかにされているが、薬物トランスポーターの誘導に関しては、不明な点が多い。そこで、本研究では、代表的な薬物トランスポーターである P-糖タンパク質 (*MDR1*) の活性型ビタミン D<sub>3</sub> (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) による誘導を制御している機構を明らかにし、誘導応答を示す培養細胞系の確立を試みた。さらにこのアッセイ系の解析を通して、P-gp の誘導における個人差が生じる機構についても解析を行った。

B. 研究方法

レポータージーンアッセイ：P-gp の遺伝子 (*MDR1*) のプロモーター領域をクローニングし luciferase 遺伝子上流につないだレポータープラスミドを作製した。ヒト小腸由来培養細胞株 Caco-2 に、上記のレポータープラスミドとヒトビタミン D 受容体 (VDR) 遺伝子およびヒトレチノイド X 受容体  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) 遺伝子の発現プラスミドをと共に co-transfection した。24 時間培養した後、VDR のリガンドである 25 nM の 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> を添加した後さらに 24 時間培養し細胞を回収した。回収した細胞溶解液中の luciferase 活性を測定し、それぞれの遺伝子についての誘導の指標とした。Transfection 効率は co-transfection した renilla luciferase 活性に基づき補正した。ゲルシフトアッセイ：ゲルシフトアッセイに用いたヒト RXR $\alpha$  および VDR は TNT T7 and SP6 Quick Coupled Transcription/Translation Systems



(Promega) を用いて *in vitro* で合成した。ゲルシフトアッセイで用いるプローブは合成したオリゴヌクレオチドをアニーリングさせて使用した。プローブの塩基配列については図 2~4 に示した。反応は 2.5  $\mu$ L の VDR と RXR $\alpha$  に 1  $\mu$ L の 5x binding buffer [15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, 2.5 mM dithiothreitol (DTT), 50% glycerol, 100 mM HEPES, pH 7.75] および 0.5  $\mu$ L の 1 mg/mL poly(dI-dC)、0.5  $\mu$ L の 0.33  $\mu$ M FITC で標識した 2 本鎖プローブを加えて、室温で 20 分間おこなった。競合実験では、非標識プローブを同時に反応系に添加した。核内受容体とプローブの複合体は、2.8 あるいは 6% の非変性ポリアクリルアミドゲル (0.5x TBE) で島津スラブゲル DNA シークエンサー-DSQ-2000L を用いて泳動し、蛍光を検出した。

### C. 研究結果

**MDR1 遺伝子上の VDR 応答領域の同定:** 活性型ビタミン D<sub>3</sub> (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) による MDR1 の誘導機構を調べるため、MDR1 の上流領域を組み込んだレポーター遺伝子と小腸由来の細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。MDR1 の転写開始点から -10082 bp ~ +117 bp を組み込んだレポーター遺伝子と VDR の発現プラスミドを Caco-2 細胞にトランスフェクションし、1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> を添加したところ、ルシフェラーゼ活性は約 8 倍に上昇した。一方、VDR の発現プラスミドをトランスフェクションしなかった細胞では、1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> によるルシフェラーゼ活性の上昇は認められなかった (図 1 A)。この結果から 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>

応答配列が MDR1 の転写開始点から上流約 10 kbp にあり、転写活性化は VDR を介していることが明らかになった。VDR の応答領域をさらに絞り込むために、VDR の応答領域を 5' 上流側から順次削除したレポーター遺伝子を作成し転写活性を測定した。その結果、図 1 A に示したように、-7970 bp ~ -7145 bp の 824 bp を欠損したレポーター遺伝子は転写活性を完全に消失した。従って、この領域に VDR の応答配列があることがわかった。さらに、図 1 B に示すように、この領域内を細かく欠損させたレポーター遺伝子を作成し転写活性を測定したところ、5' 側から 90 bp を欠損させても活性に影響はないが、153 bp 欠損させた場合、活性は減少した。従って、-7880 bp ~ -7817 bp の 63 bp に VDR の応答領域が絞り込まれた。

応答領域への VDR/ RXR $\alpha$  の結合: -7880 bp から -7810 bp の領域の塩基配列について、一般的に核内受容体の標的塩基配列に共通しているコア配列の繰り返し配列である DR (direct repeat) あるいは ER (everted repeat) といわれる塩基配列を検索したところ、図 2 A に示すように、複数の DR3 と DR4 が見つかった。そこで、この領域を Upstream cluster (UpC)、Middle cluster (MdC)、Downstream cluster (DwC) の 3 個のクラスターに分類し、それぞれのクラスターに VDR/RXR $\alpha$  が実際に結合するのかゲルシフトアッセイを用いて検討した。ゲルシフトアッセイに用いたプローブおよびコンペティターは図 2 A に示した。その結果、各クラスターに VDR/RXR $\alpha$  は結合することがわかった (図

2B)。この結合は大過剰の非特異的なコンペティターでは阻害を受けず、大過剰の非標識プローブは標識プローブの結合を完全に消失させた(図 2B)。また、各クラスターへの VDR/RXR $\alpha$  結合親和性の相対的な比較を行うために、非標識の各クラスターを用いた競合実験をおこなった。その結果、図 2B に示すように、UpC がもっとも強く結合し、MdC と MdC は同じ程度の結合力を示すことがわかった。さらに詳細に VDR/RXR $\alpha$  の結合部位を調べるために、標的コア配列の DR 配列を基本としたオリゴヌクレオチドをコンペティターとして合成し、競合実験を行った(図 2B)。その結果、DR4(I)が最も強い阻害反応を示し、続いて DR3、MdC3、DR4(III)、DR4(II)の順であった。各コア配列の関与を調べると、MdC 領域中のコア配列である Hs6 を欠如させた MdC5 は、UpC プローブの結合に対して阻害を示さなかったことから、Hs6 は VDR/RXR $\alpha$  の結合に関与していないと考えられた。次に各コア配列の 2 塩基に変位を導入したコンペティターを用いて、各コア配列の関与を調べた(図 2~3 の UpM1~DwM12)。その結果、図 2B に示すように、コア配列 Hs1 に変位を導入した UpM1 は UpC p の結合を阻害した。Hs3 に変位を導入した UpM3 は UpC の結合を弱く阻害した。Hs2 に変位を導入した UpM2 は UpC の結合を阻害しなかった。これらの結果から、Hs2 は VDR/RXR $\alpha$  と UpC との結合に必須であることがわかった。MdC プローブを用いて、同様に各コア配列の関与を調べたところ、MdC3 と VDR/RXR $\alpha$  の結合には Hs6 が必須であることがわかった(図 3)。DwC をプローブ

とした結果は図 3 に示した。その結果、DwC と VDR/RXR $\alpha$  の結合には Hs8 が重要であることがわかった。以上の結果から、MDR1 遺伝子上の VDR の応答配列としては親和性は異なるものの、UpC の DR4(I) と DR3、MdC の MdC3、DwC の DR4(III) と DR4(II)があげられることがわかった。さらに、コア配列としては Hs2、Hs6、Hs8 が DNA と VDR/RXR $\alpha$  の結合に重要であることがわかった。

1,25-(OH) $_2$ D $_3$  による MDR1 の転写活性における各 VDR 結合部位の関与：ゲルシフトアッセイの結果から、転写調節領域の -7880 bp ~ -7817 bp の 63 bp に複数の VDR の結合部位があることがわかった。そこで、各 VDR 結合部位が転写活性に実際に関与しているのか調べるために、ゲルシフトアッセイで用いたのと同じ変異をレポーター遺伝子に導入して転写活性に与える影響を調べた。実験に用いたレポーター遺伝子は図 4 に示した。図 5 に示すように、Hs5 の変異(M33)は、わずかに誘導を増強したが、Hs4 の変異(M31)は誘導に影響を与えなかったことから、これら 2 つのコア配列は転写活性に含まれないと考えられた。他のコア配列への変異の導入(M1, M2, M3, M4, M7, M12)は、誘導を減弱した。2 箇所のコア配列への変異の導入(M28, M26, M29, M22, M27, M23, M30, M38)は、相乗的に誘導を減弱させた。特に、Hs2 と Hs6、Hs3 と Hs6 に変異を導入した M22 と M29 では誘導はほとんど完全に消失した。Hs2、Hs6、Hs8 の 3 箇所に変異を入れた場合も誘導は全くみられなかった(M36)。これらの結果から、VDR の結合のうち、Hs4

と Hs5 を除く部位は 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> による P-gp の誘導に実際に寄与していることが明らかになった。また、それぞれの結合部位は相加的に作用していると考えられた。

VDR に応答する *MDR1* 遺伝子の転写調節領域上の SNP の影響: Hs6 上に一塩基多型 (SNP) が報告されているが、この SNP の生理的な意義は調べられていない。そこで、この VDR による *MDR1* 誘導におけるこの SNP の機能的な意義を調べるために、VDR/RXR $\alpha$  の結合能および VDR による転写活性化能に対する影響を調べた。その結果、MdC3 あるいは DR4(II) をプローブとしたとき、SNP を導入した MdC3 プローブではバンドが薄くなり、結合能が低下することがわかった (図 6A)。また、転写活性についても、SNP を導入することによって減少した (図 6B)。以上の結果から、Hs6 で見つかった SNP は 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> による P-gp の誘導能を低下させる可能性があると考えられ、SNP の頻度は少ないものの P-gp の誘導における個人差の原因の一つであると考えられた。

#### D. 考察

代表的な薬物トランスポーターである P-gp は小腸上皮細胞での薬物吸収のみならず、腎臓や血液脳関門で機能し、医薬品の薬物動態に大きな影響を与える。また、P-gp の発現は種々の医薬品で誘導され、その発現量には大きな個人差があるとされている。従って、P-gp の誘導を評価することは薬物相互作用を評価する上で極めて重要な課題になる。そこで、本研究課題では *in vitro* の細胞培養系で P-gp の誘導の評価系を構

築することを目的とした。

これまでの研究でいくつかの細胞培養系で P-gp が 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> によって誘導されることが報告されている。しかし、しかし、誘導量を P-gp の mRNA 量の変動で評価した場合、ほとんどの細胞培養系で 2 倍程度にとどまり、*in vivo* での顕著な誘導と違いがある。そこで、P-gp の誘導を鋭敏に測定するために、P-gp の遺伝子である *MDR1* の転写調節領域を用いたレポーターアッセイをもちいて、P-gp 誘導の評価系を作成することとした。そのために、まず 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> による誘導に応答する転写調節領域の同定を行った。その結果、転写開始点から -7880 bp ~ -7817 bp の 63 bp に複数の VDR の結合部位があることがわかり、それぞれの結合部位が相加的に *MDR1* 遺伝子の転写活性化に寄与していることがわかった。また、この転写調節領域は、種々の化合物で活性化される PXR や CAR 等の核内受容体の標的領域と重複していた。この領域の各核内受容体による転写活性化への寄与は、一部が異なっているものの、この領域が他種類の化合物による P-gp の誘導に関与していることは明らかである。従って、P-gp の誘導を評価するためのレポーター遺伝子としてはこの領域を用いることが適当であると考えられた。

この *MDR1* 遺伝子の転写調節領域には頻度はすくないものの、一塩基多型が報告されている。そこで、報告されている一塩基多型の誘導への影響を調べたところ、誘導現象は減弱した。この結果から、今回構築した実験系が、P-gp の誘導能を評価する上で有用な系であることが示された。

#### E. 結論

*MDR1* 遺伝子の 8 Kbp 上流付近に VDR/RXR $\alpha$ による誘導に必須の領域が存在することが明らかとなり、この遺伝子領域を用いることによって P-gp の誘導能を持った *in vitro* アッセイ系を構築した。このアッセイ系を用いて、*MDR1* 遺伝子上の SNP の機能に与える影響について評価を行った。

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他