

200838062A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

医薬品による有害事象の発生における個人差の要因に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 頭金 正博

平成21(2009)年 4月

# 目 次

I. 総括研究報告書	
医薬品による有害事象の発生における個人差の要因に関する研究	1
頭金 正博	
II. 分担研究報告書	
1. 医薬品有害事象の発生における遺伝薬理学的要因に関する研究	11
頭金 正博	
2. 医薬品有害作用における薬物動態の個体間変動の定量的評価法の開発	19
杉山 雄一	
3. がんの薬物療法における有害事象の発生に関する個人差の要因についての 後ろ向き研究(retrospective analysis)	
医薬品有害事象が発生した患者の背景因子に関する薬剤疫学的解析	21
山本 弘史、齋藤 充生	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	39
IV. 研究成果の刊行物・別刷	41

## 医薬品による有害事象の発生における個人差の要因に関する研究

研究代表者 頭金 正博 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 室長  
研究分担者 杉山 雄一 東京大学大学院薬学研究科 教授  
研究分担者 山本 弘史 国立がんセンター中央病院 薬剤部長  
研究分担者 齋藤 充生 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

研究要旨： 医薬品による有害事象の発生において、発現臓器への暴露量を決定する重要な要因である薬物トランスポーターに着目して、有害事象の発症における個人差が生じる要因を解析した。その結果、代表的な薬物トランスポーターである P-糖タンパク質の遺伝子転写調節領域にある一塩基置換によって P-糖タンパク質の発現量が異なる可能性を示した。また、薬物トランスポーターの機能変動が基質となる医薬品の体内動態にどの程度の影響を与えるのか定量的に予測するヒト体内動態予測モデルおよび消化管における薬物間相互作用を予測するための管腔側薬物濃度の推定法を開発した。さらに、血管新生阻害作用を有する抗がん剤であるベパシズマブについて、国立がんセンターでの実診療での実施例および日本医療データセンターのレセプトデータを用いて有害事象に関連するデータ集積を行い、有害事象の発症と関連する患者背景因子を探索する調査方法を確立した。

### A. 研究目的

市販後に明らかになる医薬品による重篤な有害事象は、発生頻度が低い場合が多いことから、発症機構に服用患者の個別的な要因が関与していると考えられる。しかし、その機構が明らかにされた例は少なく、同様の有害事象が繰り返される危険性がある。そこで、本研究においては、有害事象の発症に個人差が生じる機構を、有害事象の発症機構に大きな影響を与える薬物動態学的観点から解析することを目的とした。また、有害事象の発症機構には複数の要因が関与していると考えられ、有害事象を発症した患者の症例情報を薬剤疫学的観点から解析

することで、有害事象発症に寄与している患者背景因子を明らかにすることも目的とした。

具体的には、副作用発現臓器への暴露量を決定する重要な要因である薬物トランスポーターの発現に関して、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）の発現量における個人差が生じる機構を遺伝薬理学的観点から解析するとともに、各種の薬物トランスポーターの機能変動が基質となる医薬品の体内動態にどの程度の影響を与えるのか定量的に予測するヒト体内動態予測モデルを構築すること

を研究の目的とした。さらに、経口剤の吸収部位である消化管における薬物間相互作用を予測するための管腔側薬物濃度の推定法を開発することを研究の目的とした。

また、薬剤疫学的観点からの研究については、血管新生阻害作用を有する抗がん剤であるベバシズマブについて、国立がんセンターでの実診療での実施例を対象とした有害事象に関連するデータ集積を行い、有害事象の発症と関連する患者背景因子を探索することを目的とした。さらに、国立がんセンター以外でのベバシズマブの使用状況と副作用頻度の調査のため、日本医療データセンターのレセプトデータを用いて、ベバシズマブの併用の有無による副作用の頻度への影響を検討した。

有害事象を回避する方策を見いだすことは、厚生労働行政においても重要な課題である。本研究では有害事象発症の個人差を決定づける要因を明らかにし、事前に有害事象の発症リスクを予測する方策を提示することを最終的な目的とした。

## B. 研究方法

### 1. P-糖タンパク質 (*MDR1*) の発現量に個人差が生じる機構の遺伝薬理的解析:

*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 (Fig. 1, Fig. 5)。多型部位への変異の導入には QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いた。得られた変異導入プラスミドは、変異導入部以外の塩基配列にエラーのっていないことをシーケンシングにより確認した。ヒ

ト小腸由来培養細胞株 Caco-2 に、上記の野生型 (WT) あるいは変異型 (VT) のレポータープラスミドと核内受容体発現プラスミド、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミドを co-transfection した。24 時間培養後、各核内受容体のリガンドを添加し、さらに 3.5 時間培養した。その後、Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) により細胞内に発現しているルシフェラーゼの酵素活性を測定し、それぞれの遺伝子についての誘導の指標とした。トランスフェクション効率は、co-transfection したウミシイタケルシフェラーゼの測定値で補正した。

ゲルシフトアッセイに用いたヒト RXR $\alpha$ 、VDR、TR、CAR、PXR は TNT T7 and SP6 Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega) により *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 5'末端が FITC ラベル化されている相補的な合成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 Fig. 3 に示した。VDR、TR、CAR、PXR と RXR $\alpha$  を両方加える場合には 1:1 で混合し、10 分間室温で反応した。1  $\mu$ L の 5x binding buffer (15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 50% glycerol, 100 mM HEPES, pH 7.8) と 0.5  $\mu$ L の 1 mg/mL poly(dI-dC)、0.5  $\mu$ L の 0.33  $\mu$ M FITC ラベル化オリゴヌクレオチドを混合した。最後に *in vitro* で合成した核内受容体を 3  $\mu$ L 加え、20 分間室温で反応した。競合実験では、非標識オリゴヌクレオチド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、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シーケンサーDSQ・2000Lを用いて泳動し、蛍光を検出した。

## 2. 薬物動態の個体間変動の定量的評価法の開発：

ラット肝細胞や胆管側膜ベシクルを用いて *in vitro* パラメータを評価し、*in vivo* パラメータと比較することで、算出した補正係数 (SF) を用いて、ヒト凍結肝細胞、胆管側膜ベシクルを用いて測定した *in vitro* パラメータを補外した。臨床試験の結果から、ヒト *in vivo* パラメータを推定し、予測結果との比較を行った。ラットの体内動態解析により構築した pravastatin の体内動態記述モデルに、補外したヒト動態パラメータを代入し、血漿中濃度のシミュレーションを行った。また、主排泄経路である肝胆系輸送について、パラメータを変動させ、プラバスタチンの血漿中濃度、薬効ターゲットである肝臓中濃度に与える影響を推定した (sensitivity analysis)

また、消化管吸収における薬物間相互作用の予測については、特に併用薬による CYP3A4 の阻害による被相互作用薬の消化管吸収率の上昇の予測という観点で研究を進めるべく、ラットをモデル動物として、CYP3A の代表的な基質である midazolam をモデル基質、CYP3A の代表的な阻害剤である ketoconazole をモデル阻害剤として用いた。Midazolam は、雄性ラットに十二指腸内投与・門脈内投与・静脈内投与し、消化管のアベイラビリティと肝アベイラビリティを分離評価した。さらに、様々な投与量の ketoconazole と midazolam を同時に十二指腸内投与し、midazolam のクリアランスおよび消化管アベイラビリティを算出した。

## 3. がんの薬物療法における有害事象の発生に関する個人差の要因についての後ろ向き研究：

国立がんセンター中央病院で実施されている結腸・直腸がんにおける標準治療レジメン mFOLFOX6 療法を対象とし、当療法における患者背景及び有害事象等の程度 (Grade) について診療情報の調査により情報収集を行った。この結果をベバシズマブ併用群 (+BV) と非併用群の情報に分類しその発生状況の差異について Fisher's exact test を用い解析した。また患者背景因子と有害事象発生の関連性についても解析を検討した。

JMDC 社より、2008 年 3 月 (分析対象母数 34 万人) の 1ヶ月間に、「傷病名」に結腸がん、直腸がん、大腸がんが含まれる患者を抽出したデータ及びこれらの患者の「使用薬剤情報」を抽出したデータを購入了。フルオロウラシル系薬剤使用患者について、患者番号から「傷病名」と「使用薬剤情報」のデータを突合した。全フルオロウラシル系薬剤使用患者について、ベバシズマブの添付文書の警告欄に記載されている副作用 (消化管穿孔、術後出血、腫瘍出血、脳出血、脳血管発作、一過性脳虚血発作、心筋梗塞、狭心症、脳虚血、脳梗塞、高血圧性脳症、高血圧性クリーゼ、可逆性後白質脳症症候群) を参考に、レセプトの傷病名より抽出可能な関連副作用 (脳梗塞、狭心症、高血圧、消化管潰瘍、出血) を抽出し、ベバシズマブ非使用群、使用群で比較を行った。

(倫理面への配慮)

国立がんセンター中央病院の病院情報システムを用いた解析研究においては日常診療における有害事象の発生状況を調査するものであるため、患者が診療ならびに治療を受ける上で如何なる影響も受けない。本研究は平成 20 年 12 月 12 日に国立がんセンター倫理審査委員会により承認。同年 12 月 17 日に国立医薬品食品衛生研究所倫理審査委員会により承認を得ている。なお本研究に参加している研究者は研究対象薬剤の製造販売業者との利害関係はない。

### C. 研究結果

#### 1. P-糖タンパク質 (*MDR1*) の発現量に個人差が生じる機構の遺伝薬理学的解析:

*MDR1* の -7.9~-7.8 kbp 近辺に存在している転写調節領域には、ビタミン D 受容体 (VDR)、甲状腺ホルモン受容体 (TR)、恒常的アンドロスタン受容体 (CAR)、プレグナン X 受容体 (PXR) が結合して転写を活性化する。この領域上に -7833C>T (転写開始点を +1 とした場合の位置) の一塩基多型 (SNP) が報告されており、日本人でのアレル頻度は 0.2% 程度である。そこで、*MDR1* の誘導における -7833C>T の機能的な意義を調べるために、多型部位に変異を導入したレポータープラスミドを用いて、核内受容体ごとに転写活性化能に対する SNP の影響を調べた。その結果、-7833 C>T が VDR、TR、CAR、PXR による転写活性を低下させることが明らかとなった。そこで、次にこの SNP を含む二つのモチーフ、ER8、DR4(II) と各核内受容体との結合に SNP の及ぼす影響を検討した。その結果、-7833 番目の塩基に変異があるプローブ (VT) では、変異のないプローブ (WT)

と比べ、いずれの核内受容体の結合も低下した。以上の結果から、核内受容体の転写調節領域への結合能の低下が転写活性化の低下の原因と考えられた。

日本人の臨床検体 (大腸) や白血球を用いた *MDR1* の mRNA の発現量に対する SNPs の影響に関する論文において、5'-UTR に存在する -129T>C (開始コドン ATG の A を +1 とし、intron 1 をスキップした場合の位置、rs3213619) を有すると *MDR1* の発現量が少ないことが報告されている。この SNP は日本人でアレル頻度は 8% 程度と比較的高いが、発現量の低下の原因は現在まで明らかとされていない。日本人において -129T>C は -1211T>C、および -1847 C>T (rs28381796) と連鎖していることから、*MDR1* の誘導にこれらの SNPs が影響を与えている可能性がある。-1211 番目の塩基が T>C に置換すると、低酸素状態での遺伝子の転写調節に関与する HIF1 $\alpha$  の応答エレメントである hypoxia response element (HRE) 様の配列になる。以前の報告で *MDR1* は低酸素に応答すること、機能的な HRE が -53~-49 bp に存在することが報告されている。-1211T>C により生じる HRE 様配列が機能的な HRE に対して抑制的に作用して、*MDR1* の mRNA の発現量に影響を及ぼしている可能性があると考えた。そこで、HIF1 $\alpha$  による *MDR1* の誘導における -1211 T>C の機能的な意義を調べるために、HIF1 $\alpha$  の発現を安定化することによって低酸素状態をもたらす化合物である塩化コバルトと多型部位に変異を導入したレポータープラスミドを用いて、低酸素応答性に対する -1211T>C の影響を調べた。その結果、塩化コバルト処理を行

っても転写活性の上昇は見られず、この遺伝子配列は HRE として機能していないと考えられた。HRE 様配列に加え、-1211bp の塩基置換はメチルコランズレン (3MC) などのリガンドにより活性化されたアリルヒドロカーボン受容体 (AhR) が Arnt とダイマーを形成して結合する DNA 配列である Xenobiotic Responsive Element (XRE) 様の配列にもなる。そこで、次に -1211T>C が AhR/Arnt による *MDR1* の転写活性に与える影響を調べた。その結果、-1211bp が T アレル、C アレルどちらの場合も AhR/Arnt のリガンドである 3MC により誘導されず、XRE として機能していないと考えられた。以上の結果より、-1211T>C は、塩基置換により HRE 様配列、XRE 様配列となるものの、HRE ならびに XRE として機能していないと考えられ、-129T>C による *MDR1* mRNA の低下に関与する因子は他にあるものと考えられた。

## 2. 薬物動態の個体間変動の定量的評価法の開発:

ラットの体内動態解析により構築したプラバスタチンの体内動態記述モデルに、補外したヒト動態パラメータを代入し、血漿中濃度のシミュレーションを行い、また、主排泄経路である肝胆系輸送について、パラメータを変動させ、プラバスタチンの血漿中濃度、薬効ターゲットである肝臓中濃度に与える影響を推定したところ、ヒト胆管側膜ベシクルの輸送実験から外挿されたパラメータは、単純拡散よりも大きく、肝消失は肝取り込み過程が律速段階であることが示唆された。この結果は、ヒト凍結肝細胞から外挿されたパラメータは、ヒト肝

固有クリアランスと同程度の値を示したことから支持される。シミュレーションの結果、肝取り込み過程の変動は血液中濃度に大きく影響を与えるも、肝細胞内濃度にはほとんど影響を与えず (肝取り込み過程の低下は血中濃度の増加で補てんされる)、反対に胆管側での排出能力の変動は血液中濃度にほとんど影響を与えないものの、肝細胞内濃度には大きく影響を与えた。

Midazolam をラットに十二指腸内投与・門脈内投与・静脈内投与して、それぞれのクリアランスの比を算出することで、消化管におけるアペイラビリティ (FaFg) と肝アペイラビリティ (Fh) を分離評価したところ、 $FaFg=0.296$ 、 $Fh=0.277$  と算出され、midazolam の吸収率の悪さは、消化管吸収と肝代謝の両方に起因することが明らかとなった。次に、ketoconazole の投与量依存的な midazolam の FaFg の変動を観察したところ、ketoconazole の投与量が増加するにつれて FaFg の増加がみられ、適切な数理モデルから導かれた数式に fitting することにより、FaFg 値の最大変動の 1/2 を引き起こす投与量  $ID_{50}$  を算出することが出来た。

## 3. がんの薬物療法における有害事象の発生に関する個人差の要因についての後ろ向き研究:

患者背景として mFOLFOX6 群 105 例及び mFOLFOX+BV 群 61 例における身長・体重、体表面積、年齢、性別、Performance Status、抗がん剤投与歴、原発部位、転移の有無に関し、両群間で差異はほとんど認められなかった。また投与コース数、効果、抗がん剤投与量減量人数においてもほとんど差は認められなかった。既往歴及び生活

歴においては、飲酒歴において mFOLFOX6+BV 群が若干多かったもののそれ以外に差は認められなかった。有害事象は、診療録からの抽出においてその記載精度に応じて下記の 3 段階に分けて表記した。①事前に診療グループで設定したテンプレートに記載を行い、欠損値を防ぐ方法にて収集された有害事象、②検査値等から客観的に評価できる有害事象、③イベント発生時にカルテへ記載される有害事象。その結果、ペバシズマブ投与群は、有害事象の有無に関する比較において、出血、高血圧の発生が有意に高かった。逆に便秘に関しては有意に低かった。また重篤な有害事象の比較において、手足症候群と好中球減少の発生はペバシズマブ投与群が優位に高かった。

また、レセプト情報を用いた研究では、調査対象期間内に結腸がん、直腸がん、大腸がんがレセプトに記載されていた症例は 71 症例であった。このうち、フルオロウラシル系薬剤を使用していたのは 53 症例で、ペバシズマブを使用していたのは 6 症例であった。そこで、これらの情報を用いて「傷病名」と「使用薬剤情報」のデータを突合した。その結果、①5-FU+イリノテカンの使用症例では、ペバシズマブ非使用群は 5 例、ペバシズマブ使用群は 3 例であった。ペバシズマブ使用群で 1 例の急性心筋梗塞がみられた。両群とも 1 例の高血圧症が見られた。ペバシズマブ非使用群に 3 例、ペバシズマブ使用群に 1 例の胃潰瘍が見られた。②5-FU+オキサリプラチンの使用症例では、ペバシズマブ非使用群は 5 例、ペバシズマブ使用群は 2 例であった。両群とも 1 例の高血圧症がみられた。ペバシズマブ

非使用群の 2 例で胃潰瘍等の消化性潰瘍がみられた。③5-FU 使用症例では、ペバシズマブ非使用群は 2 例、ペバシズマブ使用群は 1 例であった。ペバシズマブ非使用群のいずれも消化性潰瘍がみられた。④テガフルール配合剤（ユーエフティー）使用症例では、28 症例あり、ペバシズマブと併用する症例はなかった。狭心症が 3 症例、脳梗塞が 1 症例みられ、膀胱出血 1 例見られた。脳梗塞の症例では、後出血も見られた。胃潰瘍（12 症例）、高血圧（6 症例）もみられた。⑤テガフルール配合剤（ティーエスワン）使用症例は 7 症例あり、ペバシズマブと併用する症例はなかった。下血、後出血（同一症例）が 1 例みられた。4 症例（下血、後出血の症例を含む）で、胃潰瘍又は胃十二指腸潰瘍が見られた。

以上の①～⑤の症例をまとめて、ペバシズマブ使用の有無で比較解析を行った。年齢中央値はいずれも 55-59 歳であった。男女比は、ペバシズマブ非使用群では男性が 78.7% で多かったが、ペバシズマブ使用群では男女同数であった。高血圧は、ペバシズマブ非使用群で 14/47 (29.8%)、使用群で 2/6 (33.3%) であり、大きな差はなかった。胃潰瘍は非使用群で 21/47 (44.7%)、使用群で 1/6 (16.7%) であり、十二指腸潰瘍は非使用群で 6/47 (12.8%)、使用群で 0/6 (0%) となり、胃潰瘍と十二指腸潰瘍を合わせた消化性潰瘍（同一症例で胃潰瘍と十二指腸潰瘍を発症している場合は重複カウントしない。以下同じ）では、非使用群で 23/47 (48.9%)、使用群で 1/6 (16.7%) であった。狭心症は非使用群で 2/47 (4.3%)、使用群で 0/6 (0%) であり、急性心筋梗塞は非使用群で 0/47 (0%)、使用群で 1/6 (16.7%)、脳梗塞は



非使用群で 1/47 (2.1%)、使用群で 0/6 (0%)であった。狭心症、急性心筋梗塞、脳梗塞を合わせた動脈血管塞栓症としては、非使用群で 3/47 (6.4%)、使用群で 1/6 (16.7%)であった。膀胱出血は非使用群で 1/47 (2.1%)、使用群で 0/6 (0%)、後出血は非使用群で 2/47 (4.3%)、使用群で 0/6 (0%)、下血は非使用群で 1/47 (2.1%)、使用群で 0/6 (0%)であり、膀胱出血、後出血、下血を合わせた出血では、非使用群で 3/47 (6.4%)、使用群で 0/6 (0%)であった。

#### D. 考察

医薬品による有害事象の発生において、発現臓器への曝露量を決定する重要な要因である薬物トランスポーターに着目して、有害事象の発症における個人差が生じる要因を解析した。その結果、プラバスタチンの場合、肝取り込み過程には薬物トランスポーターの OATP1B1 が、胆管側の排泄過程には別種類の薬物トランスポーターである MRP2 が関与していることが明らかにされた。この結果から、OATP1B1 が機能低下を生じた場合は有害事象を生じるリスクを高め、薬効にはほとんど影響をあたえず、一方、MRP2 の機能は薬効に大きく影響を与えるが、副作用の要因となる可能性は低いと考えられた。また、薬物トランスポーターの機能に影響を与える要因の一つとして、P-糖タンパク質を例として遺伝子多型の影響を調べ、P-糖タンパク質の発現量に影響を与える転写調節領域の一塩基置換を明らかにした。以上の研究から、医薬品の副作用の発症には薬物トランスポーターが寄与している場合があり、副作用の発症の個人

差には、薬物トランスポーターの遺伝子多型などが関与している場合があると考えられた。また、経口剤による消化管での薬物間相互作用も、個人差のみられる副作用であるが、相互作用の発症を予測するには消化管内容積が分からないため、現状では困難である。そこで、本研究では消化管吸収過程における CYP3A の阻害による薬物間相互作用の予測を行うために、ラットを用いて理論的にみかけの消化管内容積を求めた。さらに、阻害剤の投与量と阻害定数の間を結びつける補正値を算出した。今後は、この予測法を用いて消化管での薬物間相互作用における個人差が生じる要因を明らかにしたい。

また、新規薬理作用を有する抗がん剤であるベパシズマブの併用療法における副作用の発症に影響する患者背景因子の検討を、実診療記録とレセプトデータを用いて行った。その結果、実診療記録からは出血、高血圧、手足症候群、好中球減少などの発症頻度が、ベパシズマブの併用療法群が非使用群に比べて高いことがわかった。一方、レセプト情報を用いた検討からは、副作用の発症に関して有意な差は認められなかった。実診療記録に基づく調査は有害事象を欠損なく収集可能であり信頼性が高いが、調査範囲が限定される。一方、レセプト情報に基づく調査は性別、年齢以外の患者背景情報は得られないなどの欠点があるが、広範囲に情報を収集できる利点がある。従って、実診療記録に基づく調査とレセプト情報に基づく調査は互いに補完的な調査研究手法であると考えられる。

今後は、副作用の発症の個人差に関する薬物動態学的観点からの考察が疫学的研究

から検証可能であるか試みる必要がある。

## E. 結論

医薬品の肝臓や腎臓などの組織への取り込み過程に薬物トランスポーターが関与している場合、薬物間相互作用や遺伝子多型などによって機能低下や阻害が生じると、末梢臓器への医薬品暴露濃度を増加させ、薬効の増強・副作用の発現のリスクが高くなる。また、肝臓や腎臓内に標的がある場合は、細胞内濃度を決定する経路（代謝・排泄）の機能阻害がもっとも影響が大きい。これらの要因が医薬品の副作用の発症における個人差の要因となっている可能性が考えられた。

実診療記録とレセプト情報を用いて新規抗がん剤による副作用の発症に影響を与える患者背景について調べたところ、薬理作用から予想される副作用の発症頻度が高いことがわかったが、それ以外の副作用も検出された。薬理作用から推定できない副作用については、患者背景因子との関連を探索する必要がある。また、実診療記録とレセプト情報を用いる調査手法は互いに相補的であると考えられた。

## F. 健康危険情報

該当無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 頭金正博, 齋藤充生, 石黒昭博, 三宅真二, 鈴木美和子, 折井孝男, 長谷川隆一 病院情報システムを用いた医療用医薬品による副作用の検出に関するパイロット研究 国立医薬品食品衛生

研究所報告 126: 104-110 (2008)

- Mitsuo Saito, Ryuichi Hasegawa Chapter 6 · Investigation of New Molecular Entities of Drugs Approved in Three Regions; Japan, US and the EU; pp. 141-148 In: Drug Approval and Evaluation, Delivery and Control Editors: Anna O. Hartmann and Lea K. Neumann Publisher: Nova Science Publishers (July 2008) ISBN-13: 978-1604565331
- K Kurose, M Saeki, M Tohkin, R Hasegawa. Thyroid hormone receptor mediates human *MDR1* gene expression - Identification of the response region essential for gene expression. *Arch. Biochem. Biophys.*, 474:82-90 (2008).
- M Saeki, K Kurose, M Tohkin, R Hasegawa. Identification of the functional vitamin D response elements in the human *MDR1* gene. *Biochem. Pharmacol.*, 76:531-542 (2008).
- T Watanabe, H Kusuvara, K Maeda, Y Shitara, Y. Sugiyama Physiologically based pharmacokinetic modeling to predict transporter-mediated clearance and distribution of pravastatin in humans. *J Pharmacol Exp Ther.* 328:652-62, (2009).
- 2. 学会発表
  - 佐伯真弓, 黒瀬光一, 頭金正博, 長谷川隆一 日本薬物動態学会第 23 回年会 *MDR1* 遺伝子の 5'-FLANKING 領域における遺伝子変異の機能解析
  - M Tohkin, K Kurose, M Saeki, R

Hasegawa 15<sup>th</sup> Annual ISSX North  
American Regional Meeting  
PROMOTER ANALYSIS OF  
HUMAN *MDR1* GENE

- 齋藤充生、長谷川隆一、澤田康文第 11  
回日本医薬品情報学会総会・学術大会  
医療用医薬品添付文書に対する医師及  
び製薬企業の意識に関する比較解析
- 齋藤充生、長谷川隆一 医療薬学フォー  
ラム 2008 第 16 回クリニカルファ  
ーマシーシンポジウム 市販レセプト  
情報を用いた高脂血症治療薬の使用量  
と横紋筋融解症発生数の解析
- 齋藤充生 CBI 学会第 287 回研究講演  
会 添付文書への相互作用に関する記  
載内容の現状と提案

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

医薬品有害事象の発生における遺伝薬理学的要因に関する研究

研究分担者 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  
研究協力者 黒瀬 光一 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 主任研究官  
研究協力者 佐伯 真弓 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 流動研究員

研究要旨： 医薬品の相互作用による有害事象や医薬品による異常行動への関与が示唆されている薬物トランスポーターである P-糖タンパク質 (*MDR1*) の発現量における個人差が生じる機構を遺伝薬理学的観点から解析した。その結果、*MDR1* の転写調節領域にある・7833 C>T がビタミン D 受容体、甲状腺ホルモン受容体、恒常的アンドロスタン受容体、プレグナン X 受容体による *MDR1* の転写活性を低下させ、P-糖タンパク質の発現量を低下させることが明らかとなった。また、・1211T>C は *MDR1* の転写活性には影響を及ぼさなかった。以上の点から、・1211T>C は副作用の発生における個人差が生じる原因の一つである可能性がある。

#### A. 研究目的

医薬品の薬物動態は、副作用を発現する臓器での暴露濃度に影響を与えることによって、医薬品の重篤な副作用の発症に関与している。また、薬物動態は個人差があることが知られており、その主な原因として、代謝酵素や薬物トランスポーター遺伝子の多型があげられている。そこで、医薬品の副作用の発症に個人差が生じる要因のひとつに薬物動態における個人差が寄与している可能性がある。以上の考えから、本研究においては、有害事象の発症に個人差が生じる機構を薬物動態学的観点と遺伝薬理学的観点から解析することを目的として研究を行った。具体的には、医薬品の相互作用による有害事象や医薬品による異常行動へ

の関与が示唆されている薬物トランスポーターである P-糖タンパク質 (*MDR1*) の発現量における個人差が生じる機構を遺伝薬理学的観点から解析した。

#### B. 研究方法

レポーター遺伝子アッセイ：

*MDR1* のプロモーター領域をクローニングし luciferase 遺伝子の 5' 上流につないだレポータープラスミドを作製した (Fig. 1, Fig. 5)。多型部位への変異の導入には QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いた。得られた変異導入プラスミドは、変異導入部以外の塩基配列にエラーの入っていないことをシーケンシングにより確認した。ヒ

ト小腸由来培養細胞株 Caco-2 に、上記の野生型 (WT) あるいは変異型 (VT) のレポータープラスミドと核内受容体発現プラスミド、ウミシイタケ ルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミドを co-transfection した。24 時間培養後、各核内受容体のリガンドを添加し、さらに 3.5 時間培養した。その後、Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) により細胞内に発現しているルシフェラーゼの酵素活性を測定し、それぞれの遺伝子についての誘導の指標とした。トランスフェクション効率は、co-transfection したウミシイタケルシフェラーゼの測定値で補正した。

#### ゲルシフトアッセイ：

ゲルシフトアッセイに用いたヒト RXRa、VDR、TR、CAR、PXR は TNT T7 and SP6 Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega) により *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 5'末端が FITC ラベル化されている相補的な合成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 Fig. 3 に示した。VDR、TR、CAR、PXR と RXRa を両方加える場合には 1:1 で混合し、10 分間室温で反応した。1  $\mu$ L の 5x binding buffer (15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 50% glycerol, 100 mM HEPES, pH 7.8) と 0.5  $\mu$ L の 1 mg/mL poly(dI-dC)、0.5  $\mu$ L の 0.33  $\mu$ M FITC ラベル化オリゴヌクレオチドを混合した。最後に *in vitro* で合成した核内受容体を 3  $\mu$ L 加え、20 分間室温で反応した。競合実験では、非標識オリゴヌクレオチド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、6%の非変性ポリアクリルアミドゲル (0.5x TBE) で島津スラップゲル 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* 遺伝子の発現に及ぼす-7833C>T の影響：

*MDR1* の -7.9 ~ -7.8 kbp 近辺に存在している転写調節領域には、ビタミン D 受容体 (VDR)、甲状腺ホルモン受容体 (TR)、恒常的アンドロスタン受容体 (CAR)、プレグナン X 受容体 (PXR) が結合して転写を活性化する。この領域には DR3、DR4、ER8 など、核内受容体が認識する塩基配列パターン (モチーフ) が複数存在しており (Fig. 1)、いずれの核内受容体も複数のモチーフに結合するが、各モチーフの転写活性化への寄与割合は核内受容体ごとに異なる。モチーフを構成しているハーフサイトの一つ、Hs5 上に -7833C>T (転写開始点を +1 とした場合の位置) という一塩基多型 (SNP) が報告されており、日本人でのアレル頻度は 0.2% 程度である。そこで、*MDR1* の誘導における -7833C>T の機能的な意義を調べるために、多型部位に変異を導入したレポータープラスミドを用いて、核内受容体ごとに転写活性化能に対する SNP の影響を調べた (Fig. 2)。

まず、VDR のリガンドである活性型ビタミン D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) による *MDR1* の誘導に対する SNP の影響を調べた。転写活性は SNP を導入することによって低下した (Fig. 2A)。次に、TR のリガンドである甲状腺ホルモン (T<sub>3</sub>) による *MDR1* の誘導に対する SNP の影響を調べた (Fig. 2B)。VD<sub>3</sub> と同

様に、転写活性は SNP を導入することによって低下した。CAR を細胞内に過発現させるとリガンド非存在下で *MDR1* の誘導を起こす。従って、CAR については、過発現させた場合とさせない場合の比を比較した。CAR による転写活性は SNP を導入することによって低下した (Fig.2C)。PXR を細胞内に過発現させると転写活性が上昇し、これにリガンドであるリファンピシンを加えるとさらに 2 倍強の上昇がみられた (Fig.2D)。SNP を導入することによって PXR の過発現による誘導活性は低下したが、リファンピシンによる誘導には影響を与えなかった (Fig.2E)。以上の結果から、Hs5 上に存在する・7833C>T はリファンピシンによる P-糖タンパク質の誘導には影響を与えないものの、VD3、T3、CAR、PXR による P-糖タンパク質の誘導能を低下させる可能性があると考えられ、アレル頻度は少ないものの P-糖タンパク質の誘導における個人差の原因の一つとなっている可能性が考えられた。

上記より・7833 C>T が VDR、TR、CAR、PXR による転写活性を低下させることが明らかとなったことから、次に Hs5 を含む二つのモチーフ、ER8、DR4(II)と各核内受容体との結合に SNP の及ぼす影響を検討した。Fig. 4 に示したように、・7833 番目の塩基に変異があるプローブ (VT) では、変異のないプローブ (WT) と比べ、いずれの核内受容体の結合も低下した。以上の結果から、核内受容体の転写調節領域への結合能の低下が転写活性化の低下の原因と考えられた。

*MDR1* 遺伝子の発現に及ぼす・1211T>C の

影響:

日本人の臨床検体 (大腸) や白血球を用いた *MDR1* の mRNA の発現量に対する SNPs の影響に関する論文において、5'-UTR に存在する・129T>C (開始コドン ATG の A を +1 として、intron 1 をスキップした場合の位置、rs3213619) を有すると *MDR1* の発現量が少ないことが報告されている。この SNP は日本人でアレル頻度は 8%程度と比較的高いが、発現量の低下の原因は現在まで明らかとされていない。日本人において・129T>C は・1347T>C (転写開始点を +1 とした場合には・1211T>C となる。・7833 の変異との位置関係を一致させるため、以下・1211T>C と記述する、rs28746504)、および・1847 C>T (rs28381796) と連鎖していることから、*MDR1* の誘導にこれらの SNPs が影響を与えている可能性がある。Fig. 5 に図示したように、・1211 番目の塩基が T>C に置換すると、低酸素状態での遺伝子の転写調節に関与する HIF1 $\alpha$  の応答エレメントである hypoxia response element (HRE) 様の配列になる。以前の報告で *MDR1* は低酸素に応答すること、機能的な HRE が・53~・49 bp に存在することが報告されている。・1211T>C により生じる HRE 様配列が機能的な HRE に対して抑制的に作用して、*MDR1* の mRNA の発現量に影響を及ぼしている可能性があると考えた。そこで、HIF1 $\alpha$  による *MDR1* の誘導における・1211 T>C の機能的な意義を調べるために、HIF1 $\alpha$  の発現を安定化することによって低酸素状態をもたらす化合物である塩化コバルトと多型部位に変異を導入したレポータープラスミドを用いて、低酸素応答性に対

する・1211T>Cの影響を調べた。pMD457L (機能的な HRE のみをもつコンストラクト)を用いた場合、塩化コバルトの添加により転写活性が上昇した。これは HIF1 $\alpha$  が -53~-49 bp にある機能的な HRE に結合し、*MDR1* の誘導が起きていることを示している。機能的な HRE に加えて・1211bp 付近の HRE 様配列を含むコンストラクトである pMD2912L を用いた場合、・1211bp が T アレル、C アレルどちらの場合も pMD457L と同程度の転写活性しか見られず、HRE として機能していないと考えられた。HRE 様配列に加え、・1211bp の塩基置換はメチルコランスレン (3MC) などのリガンドにより活性化されたアリルヒドロカーボン受容体 (AhR) が Arnt とダイマーを形成して結合する DNA 配列である Xenobiotic Responsive Element (XRE) 様の配列にもなる (Fig. 5)。そこで、次に・1211T>C が AhR/Arnt による *MDR1* の転写活性に与える影響を調べた。既知の XRE を含む遺伝子である *CYP2A8* では 3MC の添加によって 5 倍程度の誘導がみられたが、・1211bp が T アレル、C アレルどちらの場合も AhR/Arnt のリガンドである 3MC により誘導されず、XRE として機能していないと考えられた。

以上の結果より、・1211T>C は、塩基置換により HRE 様配列、XRE 様配列となるものの、HRE ならびに XRE として機能していないと考えられ、・129T>C による *MDR1* mRNA の低下に関与する因子は他にあるものと考えられた。

#### D. 考察

薬物トランスポーターである P-糖タンパク質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薬物の輸送担体として機能し、医薬品の薬物動態に大きな影響を与える。このような特性から、P-糖タンパク質は医薬品の相互作用による副作用や、薬物の中枢系への分布による異常行動の誘発への関与が示唆されている。しかし、このような医薬品の副作用の発生頻度は低く、発症には個人差がある。ところで、P-糖タンパク質の発現は種々のホルモンや医薬品で誘導され、その発現量には大きな個人差があるとされていることから、P-糖タンパク質の発現量の個人差が、医薬品による副作用の発生の個人差の原因の一つである可能性が考えられる。そこで、本研究では、P-糖タンパク質の発現量における個人差が生じる機構を遺伝薬理学的観点から解析した。具体的には P-糖タンパク質の遺伝子である *MDR1* の転写調節領域にある SNPs のうち、RXR とヘテロダイマーを形成する核内受容体の応答領域内にある・7833C>T および *in vivo* で P-糖タンパク質の発現量と関連があると報告されている・129T>C と連鎖している・1211T>C の *MDR1* の転写活性に与える影響を調べた。その結果、・7833 C>T が VDR、TR、CAR、PXR による *MDR1* の転写活性を低下させ、P-糖タンパク質の発現量を低下させることが明らかとなった。また、・1211T>C は *MDR1* の転写活性には影響を及ぼさなかった。・7833 C>T は VDR、TR、CAR、PXR 等の核内受容体による *MDR1* の誘導において最も重要な領域であることから、P-糖タンパク質の発現量における個人差が生じる大きな要因であると考えられる。P-糖タンパク質の発現量が少ない場合、薬物の細胞外への排出能が低下することから、P-糖タ

ンパク質の基質となる医薬品同志による相互作用を引き起こす可能性が高くなる。また、血液脳関門でのP-糖タンパク質量が少ない場合、中枢での薬物濃度の上昇する可能性が高くなり、中枢機能への毒性が懸念される。以上の点から、-7833 C>Tは副作用の発生における個人差が生じる原因の一つである可能性がある。

#### E. 結論

医薬品の相互作用による有害事象や医薬品による異常行動への関与が示唆されている薬物トランスポーターであるP-糖タンパク質 (*MDR1*) の発現量における個人差が生じる機構を解明するため、遺伝子の転写調節領域にある2種類の一塩基置換の影響を調べた。その結果、-7833 C>Tが *MDR1* の転写活性を低下させ、P-糖タンパク質の発現量を低下させることが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- K Kurose, M Saeki, M Tohkin, R Hasegawa. Thyroid hormone receptor mediates human *MDR1* gene expression - Identification of the response region essential for gene expression. Arch. Biochem. Biophys., 474:82-90 (2008).
- M Saeki, K Kurose, M Tohkin, R Hasegawa. Identification of the functional vitamin D response elements in the human *MDR1* gene.

Biochem. Pharmacol., 76:531-542 (2008).

##### 2. 学会発表

- 佐伯真弓、黒瀬光一、頭金正博、長谷川隆一 日本薬物動態学会第23回年会 *MDR1* 遺伝子の5'-FLANKING領域における遺伝子変異の機能解析
- M Tohkin, K Kurose, M Saeki, R Hasegawa 15<sup>th</sup> Annual ISSX North American Regional Meeting PROMOTER ANALYSIS OF HUMAN *MDR1* GENE

#### 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



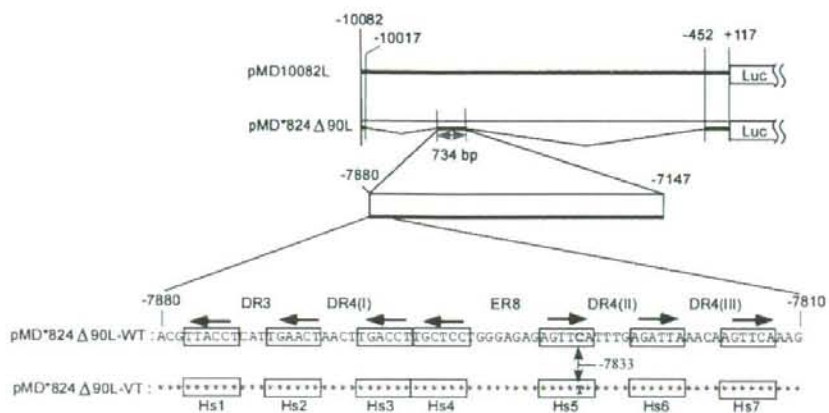


Fig. 1 Schematic representation of reporter plasmids containing the -7833C (pMD\*824Δ90L-WT) or -7833T (pMD\*824Δ90L-VT) allele.

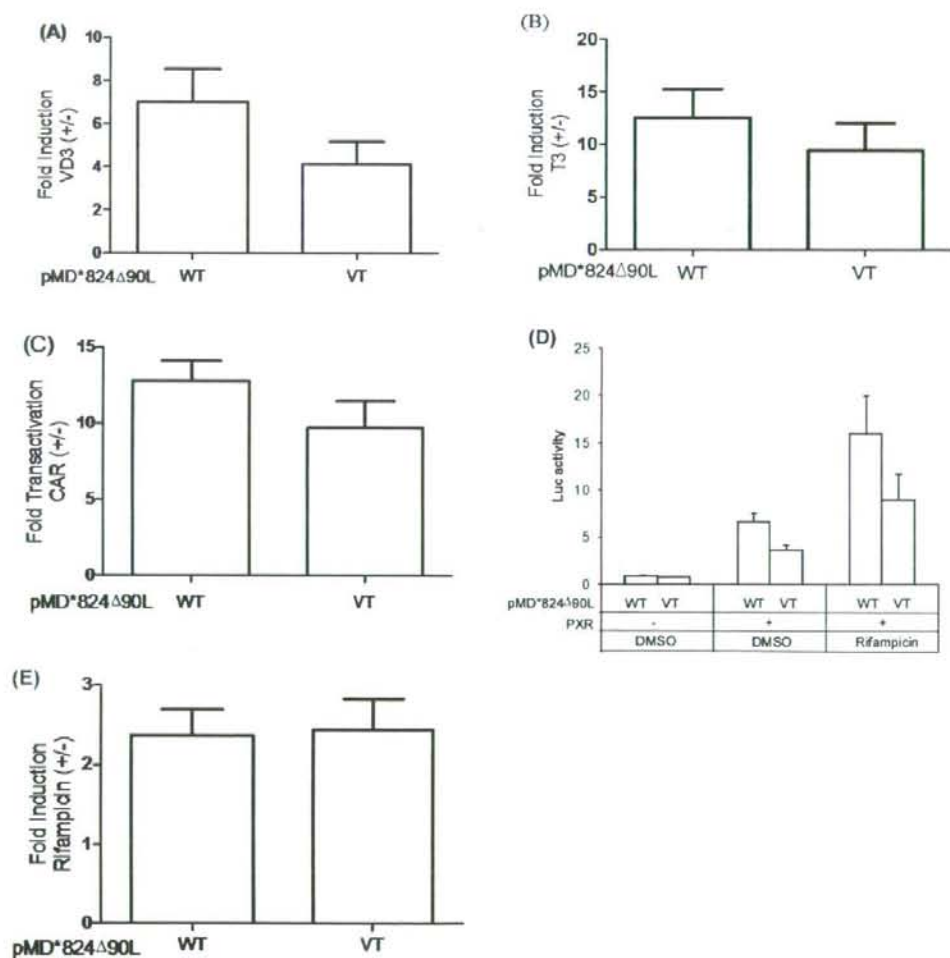


Fig. 2 Effect of the C-to-T substitution at -7833 on the activity of the VD3, T3, CAR, PXR.

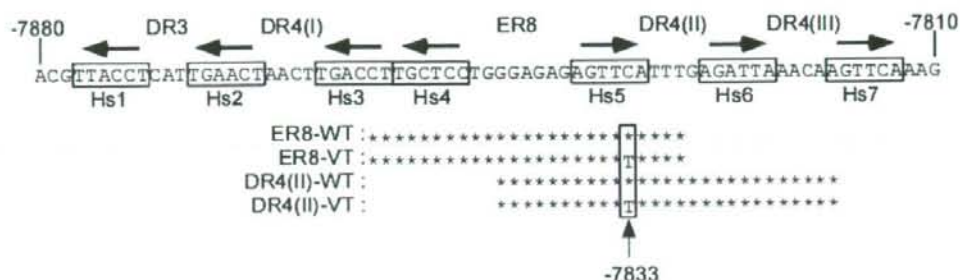


Fig. 3 The oligonucleotide sequences used for EMSA.

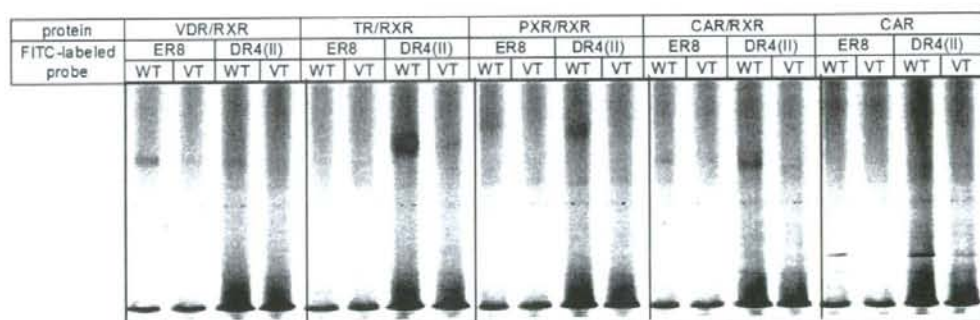


Fig. 4 The C-to-T substitution at -7833 affects the nuclear receptors binding affinity to the ER8 and/or DR4(II)

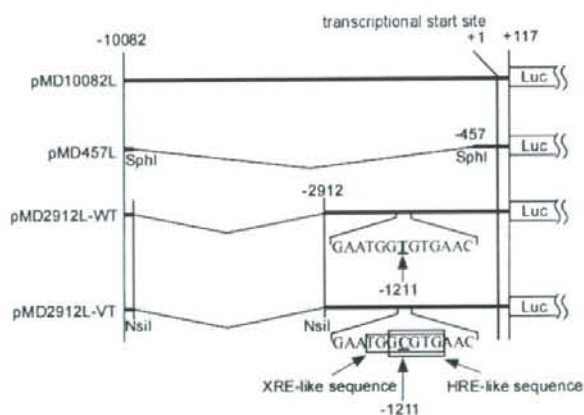


Fig. 5 Schematic representation of reporter plasmids containing the -1211T (pMD2912L-WT) or -1211C (pMD2912L-VT) allele.

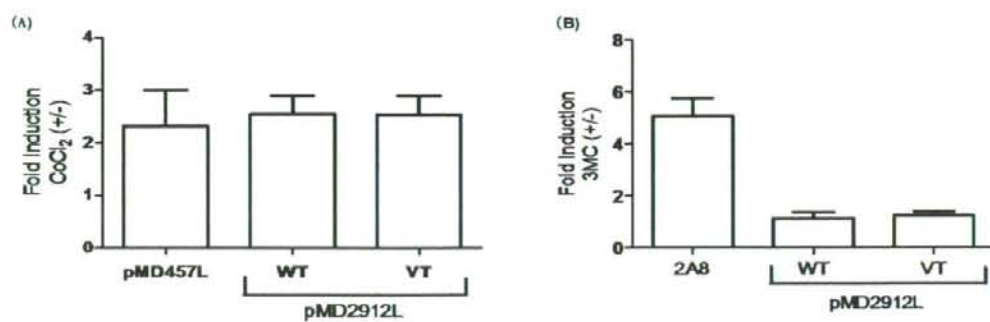


Fig. 6 Effect of the T-to-C substitution at -1211 from the transcriptional start site of the human MDR1 gene on the inducibility by CoCl<sub>2</sub> or 3MC.

医薬品有害作用における薬物動態の個体間変動の定量的評価法の開発

研究分担者 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機能変動が医薬品の体内動態に与える影響を定量的に評価するため、トランスポーターが体内動態支配要因となる医薬品について、①プラバスタチンをモデル化合物として、*in vivo* 体内動態の予測法の構築、②消化管吸収における薬物間相互作用予測のため、消化管腔内の薬物濃度を推定するための方法論の構築を目的として研究を行った。実験動物で測定したスケールリングファクターを用いて、ヒト試料で測定したパラメータを外挿した。外挿したパラメータで、プラバスタチンの血液中濃度の時間推移を説明することができた。また、血液中からの消失に関して、組織への取り込み過程が律速段階となることが示唆された。このような特性を有する化合物の場合、肝取り込みの阻害・低下は末梢臓器への暴露を大きく増加させ、有害作用が発現するリスクが高めるのに対して、胆管側での排出の機能低下が血液中濃度に与える影響は大きくないことが示唆された。また、消化管腔内の薬物濃度推定に必要な消化管腔内のみかけの容積をラットを用いて算出することにより、阻害剤の投与量と、*in vitro* 実験で得られた CYP3A の阻害定数を結びつけることで、*in vivo* における薬物間相互作用を定量的に評価できることを示した。

A. 研究目的

薬物トランスポーターは肝胆系輸送や腎尿細管分泌に働き、医薬品の体内動態支配要因として、非常に重要である。また、併用薬や食品との相互作用による発現誘導・機能阻害、遺伝的要因によるトランスポーター機能の個人差は、医薬品体内動態の変動を生じる。このような変動は、薬効標的組織、副作用発現臓器への医薬品暴露に影響を与え、薬効の増強・副作用の発現に至る。そのため、各トランスポーターの機能変動が基質となる医薬品の体内動態に、どの程度影響を与えるのか、定量的に予測するための方法論開発が必要である。本研究では、①スタチンなど副作用発現（横紋筋融解症）の発現にトランスポーターが関わる医薬品のヒト体内動態予測モデルの構築、②経口吸収部位である消化管における薬物間相互作用を予測するため、管腔側薬物濃度の推定法の開発を目的とした。

B. 研究方法

ラット肝細胞や胆管側膜ベシクルを用いて *in vitro* パラメータを評価し、*in vivo* パラメータと比較することで、算出した補正係数 (SF) を用いて、ヒト凍結肝細胞、胆管側膜ベシクルを用いて測定した *in vitro* パラメータを補外した。臨床試験の結果から、ヒト *in vivo* パラメータを推定し、予測結果との比較を行った。

ラットの体内動態解析により構築した pravastatin の体内動態記述モデルに、補外したヒト動態パラメータを代入し、血漿中濃度のシミュレーションを行った。また、主排泄経路である肝胆系輸送について、パラメータを変動させ、プラバスタチンの血漿中濃度、薬効ターゲットである肝臓中濃度に与える影響を推定した (sensitivity analysis)

また、消化管吸収における薬物間相互作用の予測については、特に併用薬による CYP3A4 の阻害による被相互作用薬の消化管吸収率の上昇の予測という観点で研究を進めるべく、ラットをモデル動物として、CYP3A の代表的な基質である midazolam をモデル基質、CYP3A の代表的な阻害剤である ketoconazole をモデル阻害剤として用いた。Midazolam は、雄性ラットに十二指腸内投与・門脈内投与・静脈内投与し、消化管のアペイラビリティーと肝アペイラビリティーを分離評価した。さらに、様々な投与量の ketoconazole と midazolam を同時に十二指腸内投与し、midazolam のクリアランスおよび消化管アペイラビリティーを算出した。

C. 研究結果

ヒト胆管側膜ベシクルの輸送実験から外挿されたパラメータは、単純拡散よりも大きく、肝消失は肝取り込み過程が律即段