

200940036A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 頭金 正博

平成22（2010）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 ----- | 1 1 |
| 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 ----- | 2 3 |
| 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 ----- | 2 7 |
| (分子標的抗がん剤の有害事象の発生した患者の個別背景因子情報の集積 と解析) | |
| ① 術前及び術後乳がんトラスツズマブ療法における有害事象発現状況 に関する研究 | |
| ② 治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸がんにおけるペバシズマブ投与を含む標準 治療 mFOLFOX6 による有害事象に関する研究 | |
| 山本 弘史 | |
| 4. 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 ----- | 3 3 |
| 東 雄一郎 | |

| | |
|---------------------------|-----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- | 4 1 |
|---------------------------|-----|

| | |
|-----------------------|-----|
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- | 4 3 |
|-----------------------|-----|

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）
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

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 東 雄一郎 国立医薬品食品衛生研究所 研究員

研究要旨： 医薬品による副作用が発生する末梢臓器で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やエピジェネティックな制御機構の一つである DNA メチル化によって P-糖タンパク質の発現量が個人によって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を検討する評価モデルを用いて、末梢臓器での医薬品の暴露量を予測したところ、組織への取り込み過程にトランスポーターが関与している場合、その機能阻害は末梢臓器への医薬品暴露を増加させ、薬効の増強・副作用の発現のリスクが高くなることを明らかにした。さらに、抗 HER2 ヒト化モノクローナル抗体である抗がん剤トラスツズマブ (T) について、国立がんセンターでの実診療での実施例のデータを用いて有害事象としての Infusion Reaction (IR) とに関連するデータ集積を行い、IR の発現状況と治療効果について後方視的に検討したところ、T による術前化学療法における IR の発現と治療効果との間に関連性が示唆された。

A. 研究目的

市販後に明らかになる医薬品による有害事象は、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、医薬品の開発過程における基礎研究や治験では、被験者の個人差に着目したデータを得ることはきわめて困難であり、承認されてのちの実臨床の場から個人差に関する有用なデータを取得する方法論の開発が必要である。そこで、本研究では、実臨床の場で得られたデータを非介入、後方視的に分析する方法で、抗がん剤による有害事象の個人差に着目した有益な知見を得ることにつ

いても目的とした。

具体的には、副作用発症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し、さらに末梢臓器への医薬品暴露により生じる有害作用の予測モデルを構築することを研究の目的とした。

また、実臨床場で得られた医薬品の使用実態や副作用データを非介入、後方視的に分析する研究については、抗 HER2 ヒト化モノクローナル抗体である抗がん剤トラスツズマブ (T) について、国立がんセンターでの実診療データを用いて有害事象としての Infusion Reaction (IR) の発症に関連するデータ集積を行い、T による術前化学療法における IR の発現とがん治療効果との間の関連性について検討した。さらに、血管新生阻害作用を有する抗がん剤のベバシズマブについて、治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸がんにおけるベバシズマブ投与を含む標準治療 mFOLFOX6 による有害事象の発症に関連する患者背景因子の探索をおこなった。

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：

細胞培養にはダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) に 10% 牛胎児血清 (FBS)、ペニシリン/ストレプトマイシン、非必須アミノ酸 (NEAA) を添加したものをを用いた。

ビタミン D 受容体 (VDR) をトランスフェクションした細胞の活性型ビタミン D₃ (VD₃) による誘導実験では、各種細胞株に VDR 発現プラスミドを transfection し、24 時間培養後、VD₃ を添加してさらに 24 時間培養した。

5-aza-2'-deoxycytidine (5aza)、トリコスタチン A (TSA) 処理細胞の VD₃ による誘導実験では、各種細胞株を 5aza 添加培地にて 96 時間培養後、TSA、VD₃ 添加培地で処理し、さらに 24 時間培養した。

これらの細胞から、RNeasy Plus Mini kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した。逆転写反応による cDNA の作成には High capacity cDNA synthesis kit (Applied Biosystems) あるいは Prime Script RT-PCR kit (Takara) を用いた。TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR は、ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) を用いて行った。遺伝子発現量の定量は、 β -actin あるいは Cyclophilin を内部標準遺伝子とし、比較 Ct 法にて解析した。

各細胞株から DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) を用いて genomic DNA を抽出した。genomic DNA のバイサルファイト変換には BisulFast DNA Modification kit

for Methylated DNA detection (Toyobo) を用いて行った。バイサルファイト処理産物をテンプレートとし、*MDR1*のプロモーター、エンハンサー領域を特異的に増幅するプライマーを使用して、PCR を行い、得られた PCR 産物を TOPO TA cloning kit for sequencing (Invitrogen) を用いてクローニングし、各クローンの塩基配列を決定して、メチル化の解析を行った。

*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。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。

2. 薬物動態の個体間変動の定量的評価法の開発：

ラットにおいて、医薬品の定速静注を行い、

定常状態で全身クリアランス、肝クリアランス、腎クリアランスを測定した。Multiple Indicator Dilution (MID) 法により、in vivo での肝取り込み能力を測定した。

ラット遊離肝細胞、ヒト凍結肝細胞、ラット・ヒト新鮮腎組織切片を用いて、細胞内への医薬品の取り込みを測定し、取り込み固有クリアランスを算出した。ラット、ヒト肝ミクロソームを用いて、肝代謝の定量を行い、肝代謝固有クリアランスを測定した。

In vitro パラメータを細胞数や含量など生理的パラメータで in vivo パラメータへと補外し、in vivo パラメータと比較した。ラットでは in vitro と in vivo パラメータの乖離を埋めるためのスケーリングファクター (SF) を設定し、ヒト in vitro パラメータの補外に使用した。

薬物動態・副作用発現両方を加味した、抗がん剤が引き起こす好中球減少症を定量的に表す数理モデルが過去に提唱されている (Friberg et al., 2002)。薬物動態、薬効(副作用)を決める個々の因子にはそれぞれ個体間変動があるが、数理モデル中においてはパラメータのばらつきとして考えることができる。そこで、過去に報告例のある docetaxel の好中球減少症を説明する PK/PD モデルを用いて、各パラメータのばらつきを考慮に入れたモンテカルロシミュレーションによる仮想的なヒトのパラメータセットを発生させ、好中球数の最低値を基に好中球減少症の重篤度の grade 判定を行った。

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：

① トラスツズマブ

国立がんセンター中央病院で実施された、

術前・術後 T 療法又は、術後 T 療法を 2008 年 2 月～2009 年 9 月に受けた乳がん患者を対象とした。副作用においては、IR、及び心障害などの発現頻度、重篤度等、患者背景について診療情報の調査により情報収集を行った。術前・術後 T 療法を行った患者については、術前・術後での T 投与による IR の発現状況、治療効果と IR の関係についても調査した。

② ベバシズマブ

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、有意差が得られた項目に関し患者背景因子と有害事象の関連性について検討した。

(倫理面への配慮)

③ 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。個人情報の取り扱いは、「国立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ガイドライン」に従った。トラスツマブにかかる研究は平成 21 年 11 月 25 日に国立がんセンター倫理審査委員会により承認を得ている。また、ベバシズマブにかかる研究は平成 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、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。

まず、VDR のリガンドである VD3 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。次に、TR のリガンドである甲状腺ホルモン (T3) による *MDR1* の誘導

に対する SNP の影響を調べた。VD3 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。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。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。

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。

一般に、プロモーターから転写開始領域にかけての CpG アイランドがメチル化されていない場合、遺伝子は転写可能な状態にある。一方、CpG アイランドがメチル化されていると、メチル化 DNA 結合タンパク質 (MBD) がメチル化 CpG 配列に結合し、更に MBD がヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) と結合し、ヒストンが脱アセチル化し、クロマチン構造が凝集して転写因子の結合が妨げられ、遺伝子は不活性化される。*MDR1* 遺伝子については急性骨髄性白血病患者のリンパ球や前立腺で、*MDR1* 遺伝子のプロモーターにおけるメチル化が亢進している検体において、メチル

化されていない検体に比べて *MDR1* mRNA 量が減少していることが報告されており、*MDR1* の発現量や誘導の個人差においても DNA メチル化が関与している可能性が考えられる。そこで、LS180 細胞、MCF-7 細胞、Caco-2 細胞の 3 種類の細胞株を用いて、VD3 を添加した際の *MDR1* と *CYP3A4* の mRNA の誘導量を比較した。その結果、LS180 では、VD3 の添加によって *MDR1* のみならず *CYP3A4* の mRNA 量が増加したが、MCF-7 では、VD3 によって *MDR1* と *CYP3A4* の mRNA の増加は見られなかった。一方、Caco-2 細胞においては、VD3 によって *CYP3A4* の誘導は見られたものの、*MDR1* の mRNA 量には変動が見られなかった。MCF-7 細胞と Caco-2 細胞で VD3 による *MDR1* の誘導がみられなかった原因として VDR の発現量が低い可能性が考えられたため、3 種類の細胞株に VDR を強制発現させて VD3 による *MDR1* mRNA の発現量を測定したところ、MCF-7 細胞では VD3 によって *MDR1* mRNA が誘導されたが、Caco-2 細胞では VDR を充分量発現させても、VD3 による *MDR1* mRNA の誘導はみられなかった。これら結果は、Caco-2 細胞においては、VD3 による遺伝子の転写活性化に必要な受容体等は細胞に備わっているものの、*MDR1* の誘導を阻害している機構があることを示唆していた。そこで、VD3 による *MDR1* 遺伝子の転写調節レベルでの活性化の程度を、*MDR1* 遺伝子の転写調節領域を用いたレポーター遺伝子を用いて測定した。その結果、今回調べた 3 種類の細胞株では、VD3 の添加によって *MDR1* 遺伝子の転写活性は上昇することが示された。従って、Caco-2 細胞では

VD3の添加によってレポータージーンの転写活性は上昇するものの、mRNAの誘導が起こっていないことが明らかになった。この測定で用いたレポータージーンは、MDR1遺伝子のプロモーター領域を用いているが、レポータージーンではCpG配列はメチル化されていない。従って、レポータージーンの結果とmRNA誘導の結果の相違は、転写調節領域でのCpG配列のメチル化に起因する可能性が考えられた。そこで、MDR1の発現誘導へのDNAのメチル化の関与を調べるために、Caco-2細胞、LS180細胞、MCF-7細胞を脱メチル化剤の5azaとHDAC阻害剤のTSAで前処理をして、MDR1遺伝子のプロモーター領域を脱メチル化し、VD3によるMDR1 mRNAの誘導の程度を測定した。その結果、LS180細胞では、VD3によるMDR1 mRNAの誘導に対して脱メチル化剤等の影響は見られなかったものの、MCF-7細胞とCaco-2細胞においては脱メチル化剤等の前処理により、MDR1 mRNAの誘導は増強された。この結果は、MCF-7細胞とCaco-2細胞においてVD3によるMDR1 mRNAの誘導がみられなかった原因の一つに、塩基のメチル化が関与していることを示唆していた。

3種類の細胞株でのMDR1遺伝子のプロモーター領域におけるCpG配列のメチル化の程度を調べたところ、MCF-7細胞においては、転写開始点付近の基本転写因子の作用する付近のメチル化の程度が高いことがわかった。しかし、Caco-2細胞では、この近傍のメチル化の程度はLS180細胞と変わらないことから、転写開始点から7kbp以上上流のVDRが作用するエンハンサー領域のメチル化の程度を測定した。その結

果、Caco-2細胞のこの領域でのメチル化の程度は、LS180細胞に比べて高いことが示された。従って、Caco-2細胞ではVDRが作用するエンハンサー領域のメチル化によってMDR1の誘導が抑制されている可能性が考えられた。

2. 薬物動態の個体間変動の定量的評価法の開発：

Pravastatin以外のアニオン性スタチンについては、MIDで測定した取り込み能力と肝固有クリアランスの値は近く、肝消失の律速段階は取り込み過程となっていることが示唆された。ラットで決定したSFを用いて、ヒト凍結肝細胞の結果をin vivoへと外挿すると、補外した取り込みクリアランスは、臨床報告から見積もったヒト肝固有クリアランスと一致しており、ヒト肝臓においても、スタチンの肝消失は取り込み律速になっていることが示唆された。ヒト肝ミクロソームから外挿した値は、肝固有クリアランスから大きく乖離していた。スタチン以外にも、candesartan, olesartan, valsartanなどサルタンの肝消失の律速段階が取り込み過程であることが示唆された。

前述の臨床試験の結果では、Odds比は、OATP1B3 rs11045585のヘテロ接合体で5.44、MRP2 rs12762549のヘテロ接合体で2.00、ホモ接合体で7.73であった。一方、シミュレーションで、docetaxelの全身クリアランスを80%にまで低下させた場合(OATP1B3の機能低下を想定)、およびdocetaxelの最大の副作用発現の半分を示す血中濃度を表す定数を70%にまで低下させた場合(MRP2の機能低下を想定)について、各パラメータのばらつきを考慮してランダムに生成された500人分の仮想パラメータセットに基づきシミュレーシ

ョンを行い、毒性非発現群と grade3, 4 の好中球減少が発現した群とで分類した際の Odds 比をそれぞれ算出したところ、5.1, 7.6 と臨床報告に近いリスクの上昇が認められた。

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：

① トラスツズマブ

対象患者は 60 人であり、その内訳は術前・術後 T 療法は 23 人、術後 T 療法は 37 人であった。

IR は 42% (術前・術後 T 療法：48%、術後 T 療法：38%) に発現し、全て Grade1, 2 であった。また、術前・術後 T 療法において、術前で IR が発現した症例の 50% は、術後においても IR を発現した。心障害は 10% でみられたが、いずれも軽度であった。

術前 T 療法を受けた症例のうち、病理学的完全奏功 (pCR) は 39% で認められた。IR を発現した症例は、発現しない症例に比べ有意に高い pCR が認められた ($p=0.013$)。他に pCR と有意な関連性が認められた因子として組織学的異型度があつた ($p=0.0365$)。IR の発現と他の因子とは有意な関連性は認められなかつた。

② ベバシズマブ

mFOLFOX6 群 105 例及び mFOLFOX+BV 群 61 例間において有意差が示唆された有害事象は、出血、血圧上昇、Hand-Foot Skin Reaction、便秘、好中球減少の 5 項目であつた。上記有害事象と各背景因子間において単変量解析を行い、出血に関して関連性が示唆された背景因子としては、Performance Status があげられた。また好中球減少に関しては、糖尿病既往歴

と性別があげられた。これら 2 つの有害事象に関し、関連性が示唆された背景因子が、有害事象発生に影響を与えうる因子であるかどうかロジスティック重回帰分析を用い解析した。好中球減少に影響を及ぼす背景因子として性別の関連性のみが示唆された。女性の方が男性よりベバシズマブ併用投与による好中球減少を起こしやすいと解釈される。

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。まず、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一塩基置換 (-7833 C>T) および DNA のメチル化がビタミン D 受容体等による *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つた。以上の点から、一塩基置換およびエピジェネティックな制御機構の一つである DNA メチル化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考えられる。また、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研究から、アニオン性医薬品の血中動態は主にクリアランス臓器への取り込みに関わるトランスポーターの輸送能力で決定され、代謝・排

排泄過程の機能変動は律速が変わるほど大きな影響でなければ、血液中濃度にはほとんど影響しないことを明らかにした。さらに、docetaxel の肝取り込みに関わるトランスポーターを明らかにし、その遺伝子多型により生じる肝取り込み能力の個人間変動に基づいて、血中動態の曝露の変動ならびに有害作用である好中球減少をコンパートメントモデルとモンテカルロシミュレーション法により予測したところ、取り込みトランスポーターの遺伝子多型による輸送機能の低下に伴い、好中球減少の発症リスクを再現するモデルの構築に成功した。これらの研究成果より、取り込みクリアランスと組織固有クリアランスが一致したことから、临床上重要なスタチンやサルタンなどアニオン性医薬品について、取り込み過程が全体の律速段階となっていることが示唆された。この結果、代謝過程の薬物間相互作用が、代謝酵素の阻害から予測されるほど血液中濃度が増加しない、という臨床試験の結果とも一致している。すなわちアニオン性薬物の血中曝露を決定する要因は、取り込み過程に働くトランスポーターの輸送能力であることを意味し、代謝に関わる酵素や管腔側への排出に関わるトランスポーターの機能の若干の変動は、血液中濃度に影響を与えないことを示している。スタチン同様、末梢臓器への曝露（ひいては薬効や有害作用発現）は取り込み過程のトランスポーターの機能変動（薬物間相互作用や遺伝子多型）が密接に関連しており、肝臓内に標的蛋白が存在している場合には、取り込み過程ではなく、代謝や排泄過程の変動が大きく関与する。この場合、血漿中濃度の変動からだけでは判断できないため、薬効レベルでの相互作用あるいは個人間変動要因と考えられている中にも

動態で説明できる可能性がある。また、肝取り込み能力の遺伝子多型と前駆細胞での docetaxel に対する感受性を決定するトランスポーターの機能変動により、臨床で報告されている Odds 比を再現することができた。臨床報告ではヘテロでの報告に留まるが、シミュレーションの結果、ホモで変異を有する場合の Odds 比は野生型をホモで有する患者に比べて 30 倍にも達することが示唆された。

実臨床の場で得られたデータを非介入、後方視的に分析する方法で、抗がん剤の有害事象の個人差に着目した有益な知見を得ることを目的として実施したトラスツズマブ (T) による IR 発現に関する研究から、IR の発現率は 42% であり、インタビューフォームに記載されている転移性乳癌の発現率 (42.4%) と同等であった。術前 T 療法で IR を発現した症例では、術後 T 療法でも 50% が IR を発現しており、IR の発現について患者に十分に説明をする必要がある。心障害は 10% でみられたがいずれも軽度であり、治療の継続が可能であった。

治療効果と IR の間に有意な関連性が認められた。IR の発現が認められた症例において、pCR の割合が高くなることが明らかになった。さらに組織学的異型度においても治療効果と有意な関連性が認められた。

新規薬理作用を有する抗がん剤であるベバシズマブ投与により、出血及び血圧上昇リスクが高まった結果が得られた。当事象は他の報告 (TREE Study、E3200 study) でも支持される。また出血のリスクを高める背景因子の単変量解析により、Performance Status の関連性が示唆された。Performance Status はベバシズマブ投与群の Overall Survival に寄与することが報

告 (TREE Study) されており、当結果を支持することに繋がると考察する。多変量解析の結果、好中球減少に及ぼす背景因子として、性別の関連性が示唆された。女性の方がベバシズマブ併用投与による好中球減少を起こしやすい。本知見は、今までに報告は無い。この機序に関しては未知であり、今後その背景因子との関連性を確認する必要がある。今回の手法で得られた情報は、併用が余儀なくされる抗がん剤治療において、薬剤師が事前に注意喚起することに繋がり、安全性確保に役立てる手段の一つとなりうる。

E. 結論

副作用の発症臓器での暴露量に影響を与え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一塩基置換および DNA メチル化の影響を調べた。その結果、-7833 C>T の塩基置換および DNA メチル化が *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可能性が示唆された。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研究からは、実験動物を用いた試験により設定した SF を用いることで、ヒト体内動態を予測できるものと考えている。平成 20 年度の成果が、他のスタチン、サルタンについても当てはまることを示唆する結果を得た。組織への取り込み過程にトランスポーターが関与している場合、その機能阻害は末梢臓器への医薬品暴露を増加させ、薬効の増強・副作用の発現のリスクが高くなる。肝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)

の機能阻害がもつとも影響が大きい。

その一例として、抗がん剤である docetaxel について、肝取り込み能力と血中曝露の増加による重篤な好中球減少の発症リスクの予測を試みた。OATP1B3, MRP2 のわずかな機能変動によって臨床で報告された好中球減少症の発症リスクの上昇を十分説明しうることを *in silico* での数理モデルを用いた解析の結果からの考察によって明らかとした。

実診療記録を用いた調査研究から、術前 T 療法で IR を発現した症例では、術後 T 療法でも 50% が IR を発現した。術前、術後 T 療法で発現した IR と心障害はいずれも重症度の低いものであり、治療の継続が可能であった。術前 T 療法における IR の発現と治療効果との間に有意な関連性が明らかになり、IR の発現は効果予測因子となりえる可能性が示された。また、ベバシズマブを含む抗がん剤併用療法に関する集積症例の多変量解析によって、好中球減少と性別の関連性が示唆された。これらの一連の研究により、新しい機序による抗がん剤の有害事象に関連した個人的要因について、集積データを後ろ向きに解析する方法の有用性が示された。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- Maekawa K, Harakawa N, Sugiyama E, Tohkin M, Kim SR, Kaniwa N, Katori N, Hasegawa R, Yasuda K, Kamide K, Miyata T, Saito Y, Sawada

J. Substrate-dependent functional alterations of seven CYP2C9 variants found in Japanese subjects. *Drug Metab Dispos.* 37(9):1895-903 (2009).

- Sugiyama E, Lee SJ, Lee SS, Kim WY, Kim SR, Tohkin M, Hasegawa R, Okuda H, Kawamoto M, Kamatani N, Sawada J, Kaniwa N, Saito Y, Shin JG. Ethnic differences of two non-synonymous single nucleotide polymorphisms in CDA gene. *Drug Metab Pharmacokinet.* 24(6):553-556 (2009).
- Watanabe T, Kusuhara H, Maeda K, Kanamaru H, Saito Y, Hu Z, Sugiyama Y. Investigation of the rate-determining process in the hepatic elimination of HMG-CoA reductase inhibitors in rats and humans. *Drug Metab Dispos.* 38:215-22 (2010).
- Watanabe T, Kusuhara H, Maeda K, Shitara Y, Sugiyama Y. 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

- M Tohkin, M Saeki, J Ishida, K Kurose, R Hasegawa INTERACTION OF PREGNANE X RECEPTOR AND VITAMIN D RECEPTOR IN *CYP3A4* GENE EXPRESSION 第 24 回日本薬物動

態学会年会 (京都)

- 黒瀬光一、佐伯真弓、小泉朋子、頭金正博、長谷川隆一 *MDR1* 遺伝子の発現誘導に関わる 5'上流領域の解析 第 32 回日本分子生物学会年会 (横浜)
- 術前、又は術後 Trastuzumab 療法における Infusion Reaction の発現状況と治療効果の検討 第 8 回臨床腫瘍学会年会

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
なし

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）
研究分担報告書

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一塩基置換 (-7833 C>T) および DNA のメチル化がビタミン D 受容体等による *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。以上の点から、一塩基置換およびエピジェネティックな制御機構の一つである DNA メチル化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考えられる。

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の遺伝子多型や microRNA、エピジェネティックな制御による機能や発現の個人差があげられている。従って、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*) の発現量及び誘導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。今年度は特に DNA メチル化に着目して研究を行った。

B. 研究方法

細胞株の培養と *MDR1* mRNA の定量：

細胞培養にはダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) に 10% 牛胎児血清 (FBS)、ペニシリン/ストレプトマイシン、非必須アミノ酸 (NEAA) を添加したものをを用いた。

ビタミン D 受容体 (VDR) をトランスフェクションした細胞の活性型ビタミン D₃ (VD₃) による誘導実験では、各種細胞株に VDR 発現プラスミドを transfection し、

24 時間培養後、VD3 を添加してさらに 24 時間培養した。

5-aza-2'-deoxycytidine (5aza)、トリコスタチン A (TSA) 処理細胞の VD3 による誘導実験では、各種細胞株を 5aza 添加培地にて 96 時間培養後、TSA、VD3 添加培地で処理し、さらに 24 時間培養した。

これらの細胞から、RNeasy Plus Mini kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した。逆転写反応による cDNA の作成には High capacity cDNA synthesis kit (Applied Biosystems) あるいは Prime Script RT-PCR kit (Takara) を用いた。TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR は、ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) を用いて行った。遺伝子発現量の定量は、 β -actin あるいは Cyclophilin を内部標準遺伝子とし、比較 Ct 法にて解析した。

レポータージーンアッセイ：

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。各細胞株に、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。

DNA メチル化の検出：

各細胞株から DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) を用いて genomic DNA を抽出した。genomic DNA のバイサルファイト変換には BisulFast DNA Modification kit for Methylated DNA detection (Toyobo) を用いて行った。バイサルファイト処理産物をテンプレートとし、*MDR1* のプロモーター、エンハンサー領域を特異的に増幅するプライマーを使用して、PCR を行い、得られた PCR 産物を TOPO TA cloning kit for sequencing (Invitrogen) を用いてクローニングし、各クローンの塩基配列を決定して、メチル化の解析を行った。

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、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 VD3 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 (T3) による *MDR1* の誘導に対する SNP の影響を調べた (Fig. 2B)。VD3 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。

MDR1 遺伝子の発現に及ぼす DNA メチル化の影響:

一般に、プロモーターから転写開始領域にかけての CpG アイランドがメチル化されていない場合、遺伝子は転写可能な状態にある。一方、CpG アイランドがメチル化されていると、メチル化 DNA 結合タンパク質 (MBD) がメチル化 CpG 配列に結合し、更に MBD がヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) と結合し、ヒストンが脱アセチル化し、クロマチン構造が凝集して転写因子の結合が妨げられ、遺伝子は不活性化される。*MDR1* 遺伝子については急性骨髄性白血病患者のリンパ球や前立腺で、*MDR1* 遺伝子のプロモーターにおけるメチル化が亢進している検体において、メチル化されていない検体に比べて *MDR1* mRNA 量が減少していることが報告されており、*MDR1* の発現量や誘導の個人差においても DNA メチル化が関与している可能性が考えられる。そこで、LS180 細胞、MCF-7 細胞、Caco-2 細胞の 3 種類の細胞株を用いて、VD3 を添加した際の *MDR1* と CYP3A4 の mRNA の誘導量を比較した (Fig. 3,4)。その結果、LS180 では、VD3 の添加によって *MDR1* のみならず CYP3A4 の mRNA 量が増加したが、MCF-7 では、VD3 によって *MDR1* と CYP3A4 の mRNA の増加は見られなかった。一方、Caco-2 細胞においては、VD3 によって CYP3A4 の誘導は見られたものの、*MDR1*

の mRNA 量には変動が見られなかった (Fig. 3,4)。MCF-7 細胞と Caco-2 細胞で VD3 による MDR1 の誘導がみられなかった原因として VDR の発現量が低い可能性が考えられたため、3 種類の細胞株に VDR を強制発現させて VD3 による MDR1 mRNA の発現量を測定したところ、MCF-7 細胞では VD3 によって MDR1 mRNA が誘導されたが、Caco-2 細胞では VDR を充分量発現させても、VD3 による MDR1 mRNA の誘導はみられなかった (Fig. 5)。これら結果は、Caco-2 細胞においては、VD3 による遺伝子の転写活性化に必要な受容体等は細胞に備わっているものの、MDR1 の誘導を阻害している機構があることを示唆していた。そこで、VD3 による *MDR1* 遺伝子の転写調節レベルでの活性化の程度を、*MDR1* 遺伝子の転写調節領域を用いたレポータージーンを用いて測定した。その結果、Fig. 6 に示したように、今回調べた 3 種類の細胞株では、VD3 の添加によって *MDR1* 遺伝子の転写活性は上昇することが示された。従って、Caco-2 細胞では VD3 の添加によってレポータージーンの転写活性は上昇するものの、mRNA の誘導が起こっていないことが明らかになった。この測定で用いたレポータージーンは、*MDR1* 遺伝子のプロモーター領域を用いているが、レポータージーンでは CpG 配列はメチル化されていない。従って、レポータージーンの結果と mRNA 誘導の結果の相違は、転写調節領域での CpG 配列のメチル化に起因する可能性が考えられた。そこで、MDR1 の発現誘導への DNA のメチル化の関与を調べるために、Caco-2 細胞、LS180 細胞、MCF-7 細胞を脱メチル化剤の 5aza と HDAC 阻害

剤の TSA で前処理をして、*MDR1* 遺伝子のプロモーター領域を脱メチル化し、VD3 による MDR1 mRNA の誘導の程度を測定した。その結果、Fig. 7 に示すように、LS180 細胞では、VD3 による MDR1 mRNA の誘導に対して脱メチル化剤等の影響は見られなかったものの、MCF-7 細胞と Caco-2 細胞においては脱メチル化剤等の前処理により、MDR1 mRNA の誘導は増強された。この結果は、MCF-7 細胞と Caco-2 細胞において VD3 による MDR1 mRNA の誘導がみられなかった原因の一つに、塩基のメチル化が関与していることを示唆していた。

MDR1 遺伝子の転写調節領域における DNA メチル化パターンの測定：

3 種類の細胞株での *MDR1* 遺伝子のプロモーター領域における CpG 配列のメチル化の程度を調べたところ、Fig. 8 に示すように、MCF-7 細胞においては、転写開始点付近の基本転写因子の作用する付近のメチル化の程度が高いことがわかった。しかし、Caco-2 細胞では、この近傍のメチル化の程度は LS180 細胞と変わらないことから、転写開始点から 7kbp 以上上流の VDR が作用するエンハンサー領域のメチル化の程度を測定した (Fig. 9)。その結果、Caco-2 細胞のこの領域でのメチル化の程度は、LS180 細胞に比べて高いことが示された。従って、Caco-2 細胞では VDR が作用するエンハンサー領域のメチル化によって MDR1 の誘導が抑制されている可能性が考えられた。

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。また、P-糖タンパク質はシクロスポリンジゴキシン等の輸送担体となることから、これらの薬剤による薬物間相互作用による副作用の発症に寄与していることが示唆されている。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、*MDR1* の誘導に関与する核内受容体の応答領域内にある -7833C>T 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。-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に存在していることから、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。また、プロモーター領域の CpG アイランドがメチル化されることによって、遺伝子の転写が阻

害されることが知られていることから、*MDR1* の誘導におけるメチル化の影響を調べた。その結果、転写開始点付近のプロモーター領域および核内受容体が作用する転写開始点から 7kbp 以上上流にあるエンハンサー領域における CpG 配列のメチル化により *MDR1* の誘導が阻害されている可能性が示唆された。CpG メチル化は、主に発生分化の段階で確立されるが、近年、このメチル化パターン形成期の化学物質等の暴露によって、メチル化のパターンが変化する可能性が指摘されている。従って、発生分化の段階での化学物質等の暴露の個人差が *MDR1* の発現量における個人差が生じる要因の一つである可能性が考えられる。

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 の一塩基置換およびプロモーターとエンハンサー領域での CpG のメチル化の程度の違い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一塩基置換および DNA メチル化の影響を調べた。その結果、-7833

C>T の塩基置換および DNA メチル化が *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可能性が示唆された。

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

- M Tohkin, M Saeki, J Ishida, K Kurose, R Hasegawa
INTERACTION OF
PREGNANE X RECEPTOR
AND VITAMIN D RECEPTOR
IN *CYP3A4* GENE
EXPRESSION 第24回日本薬物動態学会年会 (京都)
- 黒瀬光一、佐伯真弓、小泉朋子、頭金正博、長谷川隆一 *MDR1* 遺伝子の発現誘導に関わる 5'上流領域の解析 第32回日本分子生物学会年会 (横浜)

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

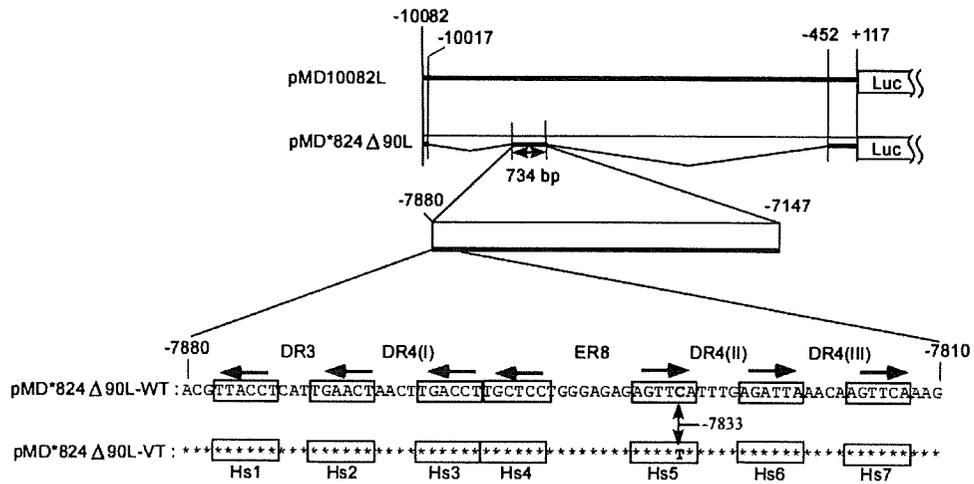


Fig. 1 Schematic representation of reporter plasmids containing the -7833C (pMD*824 Δ90L-WT) or -7833T (pMD*824 Δ90L-VT) allele.

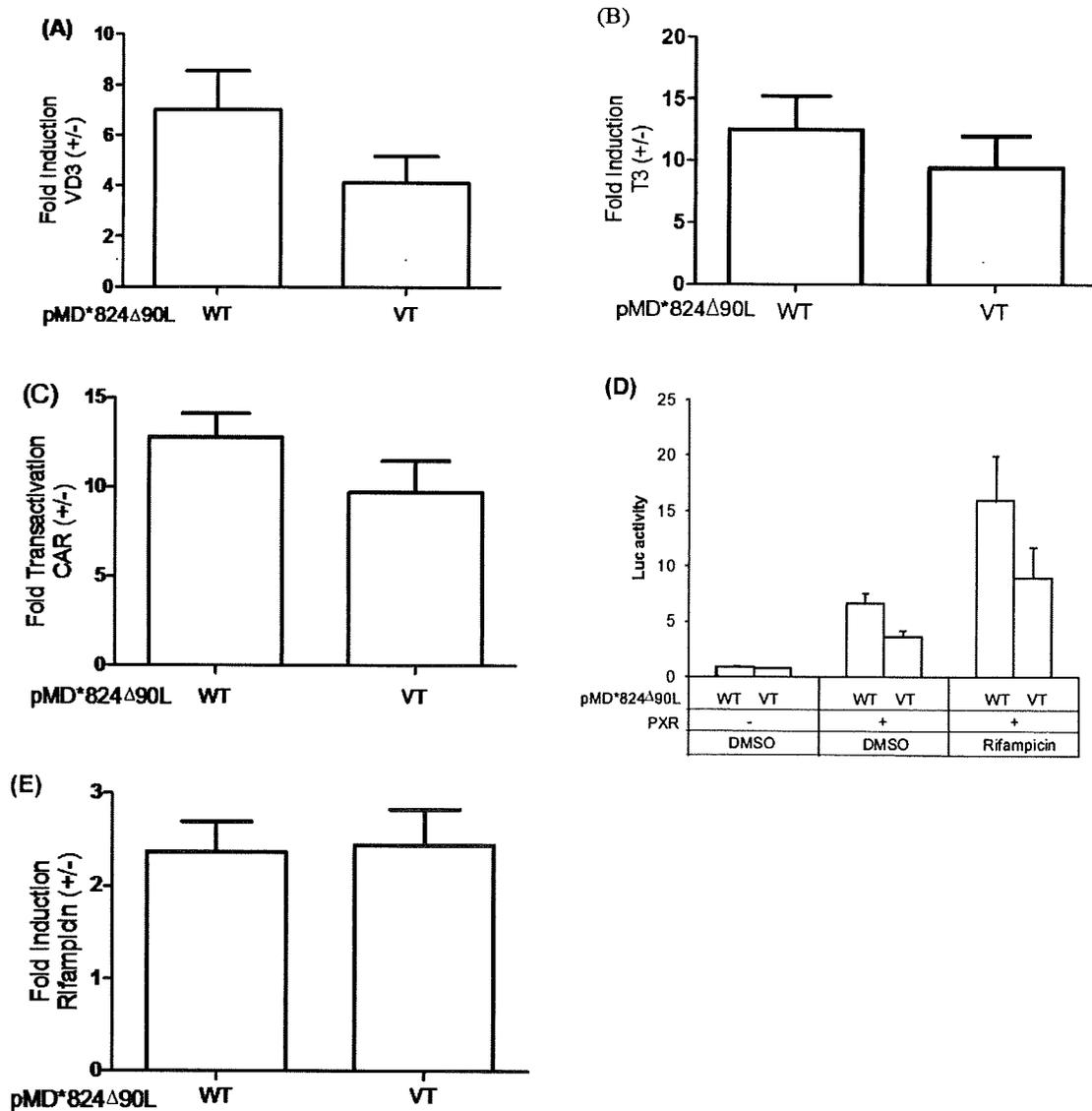


Fig. 2 Effect of the C-to-T substitution at -7833 on the activity of the VD3, T3, CAR, PXR.

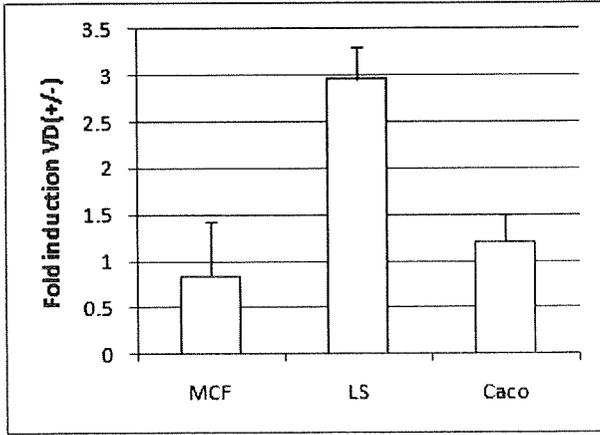


Fig. 3 VD₃ induced MDR1 mRNA

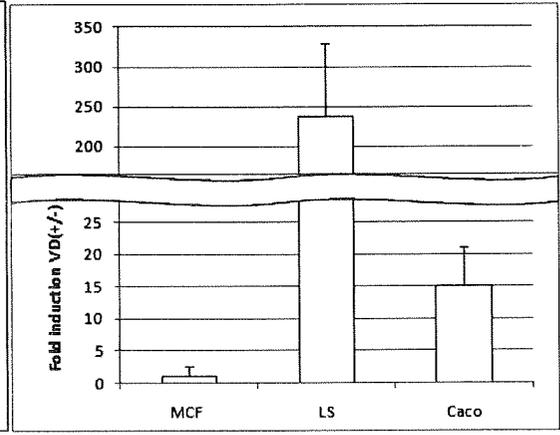


Fig. 4 VD₃ induced CYP3A4 mRNA

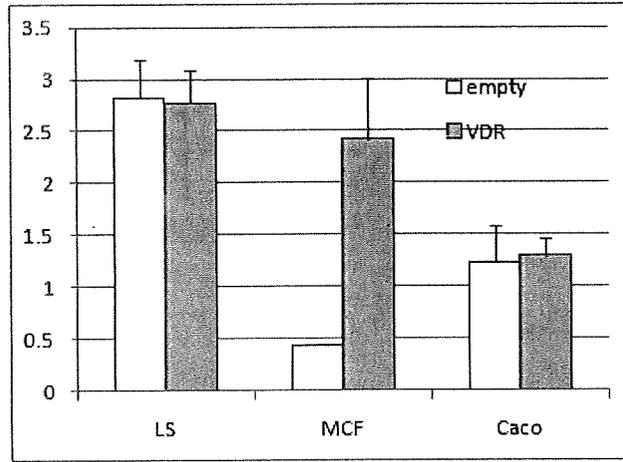


Fig. 5 VD₃ induced MDR1 mRNA in the presence of VDR