

201034009A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 頭金 正博

平成23（2011）年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
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	
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 -----	1 7
杉山 雄一	
3. 電子カルテ情報を対象としたレトロスペクティブスタディーによる 医薬品の有害事象発生の個人差に関する調査研究 -----	2 1
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-----	2 7
東 雄一郎	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	3 9
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	4 1

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の発生に関与することが知られてい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。具体的には代表的な薬物トランスポーターである P-糖タンパク質の甲状腺ホルモンによる遺伝子転写調節機構を解析し、遺伝子転写調節領域に甲状腺ホルモン受容体による発現誘導に必須の新たな制御領域を発見し、その領域に結合する核タンパクが、甲状腺ホルモンによる P-糖タンパク質の誘導に関与する事を示唆するデータを得た。また、トランスポーターが関与する臨床薬物間相互作用の情報を収集し、それらの強度を *in vitro* 試験系の結果から予測する研究を行い、相互作用の強度が半定量的に予測可能な手法を開発した。さらに、抗悪性腫瘍剤（ソラフェニブおよびカペシタビン）による副作用の一つである手足症候群の発症と患者背景因子、治療効果、予防・対処方法との関係について、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後方視的に検討した。その結果、カペシタビンによる手足症候群発現に影響を及ぼす患者背景因子は確認できなかったが、カペシタビンの治療効果と手足症候群の発現との間に関連性が示唆された。また、ソラフェニブによる手足症候群発現には開始投与量の違いが相関することが示唆された。

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、薬物間相互作用等の副作用の発現に大きく関与していることが知られてい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、肝臓の取り込みトランスポーター OATP(Organic anion transporting polypeptide)によって肝取り込みされる12種の有機アニオン系薬物に着目し、それらが被相互作用薬となる臨床での薬物間相互作用の強度を、*in vitro* 実験の結果を用いて統一された方法に基づき定量的に予測することを目指した。

また、実臨床の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、抗がん剤であるソラフェニブおよびカペシタビンについて、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手足症候群(HFS)の発症に関連するデータ集積を行い、HFSの発症と患者背景因子、治療効果、予防・対処方法との関係について検討した。

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学的解析：

MDR1 の発現制御領域の欠失変異体の作

成は *wild-type* を基に In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit (クロンテック) を用いて行った。その他の変異の導入には 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 Synthetic poly(A)signal/transcriptional pause site から SV40 late poly(A) signal までの範囲について、変異導入部以外すべて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。ルシフェラーゼアッセイは Caco-2 細胞を 1.8×10^4 cells/well になるよう 10% FBS-DMEM 中で調整し、96 穴プレートに播種し、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養した。ホタル ルシフェラーゼ遺伝子上流に *MDR1* 遺伝子の転写制御領域を連結したレポータープラスミド (100 ng)、核内受容体発現プラスミド (10 ng)、ウミシイタケ ルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミド (10 ng)、トランスフェクション試薬 HilyMax (Dojindo) をプロトコールに従い細胞へ添加し、遺伝子導入を行った。24 時間後、甲状腺ホルモン (T₃) を添加し、その 3.5 時間後に、細胞内に発現しているルシフェラーゼの酵素活性を Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) により化学発光として測定した。トランスフェクション効率、コトランスフェクションしたウミシイタケ 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は 5'末端を FITC ラベル化したオリゴヌクレオチドをプライマーとして当該領域を PCR 法により増幅し、精製後、プローブとして用いた。1 μL の 5x binding buffer (15 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 50% glycerol, 100 mM HEPES,

pH 7.8), 0.5 μ L の 1 mg/mL poly(dI-dC), 0.5 μ L の 0.33 μ M FITC 標識プローブを混合した。最後に Caco-2 の核抽出液タンパクを 5 μ g 加え、20 分間室温で反応した。サンプルは 6% Long Ranger ゲル (Lonza) と 0.5X TBE バッファーを用いて DSQ-2000L で電気泳動した。

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：

肝臓の取り込みトランスポーターOATP によって肝臓内にとりこまれることが知られている有機アニオン系薬物である atorvastatin, pravastatin, rosuvastatin, fluvastatin, pitavastatin, cerivastatin, repaglinide, nateglinide, glibenclamide, glimepiride, irbesartan, telmisartan の 12 化合物が関与する薬物間相互作用の事例を網羅的な文献検索により収集した。続いて、対象とした各基質について、トランスポーターや代謝酵素の基質認識に関する情報や各基質のヒトにおける臨床薬物動態パラメータを収集し、以後の計算に必要なパラメータをさらに算出した。また、阻害剤側の薬物動態パラメータや各代謝酵素・トランスポーター分子に対する阻害定数なども同様に収集した。さらに、文献情報により阻害実験に関する情報を確認できなかった化合物のうち、以後の相互作用の解析に必要な代謝酵素やトランスポーターに対する阻害定数については、*in vitro* 実験を新たに行うことで取得した。相互作用強度の予測計算を行う際には、まず基質化合物の消化管アベイラビリティと臓器固有クリアランスを、過去の報告より収集された薬物動態パラメータより、クリアランスコンセプトと *dispersion model* によって算出した。肝臓と腎臓の固有クリアランスの阻

害を考慮する際には、阻害剤による競合阻害を仮定して固有クリアランスの変動率を予測した上で、*dispersion model* によって臓器クリアランスの変動率を算出した。また、肝臓・腎臓における薬物消失では、H20・21 年度の成果に基づき、肝取り込みトランスポーターによる輸送が、全体の固有クリアランスの律速段階を担っていると考え、代謝酵素や *apical* 側の排出トランスポーターの阻害は血中 AUC には影響を与えないものとして計算を行った。また、*in vitro* 系によって予期されなかった相互作用が臨床で発生することを防ぐため、今回の予測法では、肝取り込みトランスポーターに対する阻害を評価する際において用いる阻害剤の濃度は阻害剤の肝臓入口における血中最大蛋白非結合型濃度の予測値を、腎取り込みトランスポーターに対しては、循環血中最大蛋白非結合型濃度を用いて計算した。一方で、消化管における薬物間相互作用の予測においては、小腸の代謝酵素阻害では DIN (*drug interaction number: Dose / Ki* 値) が 2.8 L を超えた場合、排出トランスポーターの阻害では 10.8 L を超えた場合に消化管における相互作用が起こると考え、その場合には、*FaFg* が最大値である 1 にまで上昇すると仮定して計算した。以上のように、*false-negative* な予測を避けるためにある程度の過大評価を許した予測方法に基づき、基質の血中 AUC の上昇率を予測した。

3. 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：

有害事象情報の収集は国立がん研究センター中央病院で、ソラフェニブあるいはカペシタビンの投与が開始された症例について、電子カルテから調査項目を抽出した。

ソラフェニブについては、対象期間：2008年3月～2010年10月、対象疾患：腎細胞がん、肝細胞がん、対象化学療法レジメン：単独、シスプラチン肝動注併用の患者を対象にした。カペシタビンについては国立がん研究センター中央病院で、2007年8月1日から2010年3月31日の間にカペシタビン投与が開始された乳がん患者について、以下の診療情報が電子カルテから抽出され、匿名化された後に国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部へ電子データとして提供された。調査項目は次の通りである。

【患者背景に関する項目】

診断名(Stage 分類)、年齢、性別、身長、体重、体表面積、HER2 status、ホルモン受容体、PS、Child-Pugh 分類、転移部位、既往歴(合併症)、処方薬(併用薬)、喫煙の有無、飲酒の有無、アレルギーの有無、その他(活動度、生活パターン、職業、スキンケア励行の有無 等)

【治療・抗がん剤に関する項目】

抗がん剤の投与量、投与状況(投与期間・休薬・再開)、治療クール数、前治療歴、併用した抗がん剤、治療効果(RECIST、腫瘍マーカー 等)

【有害事象に関する項目】

皮膚症状発現時期、grade、皮膚症状消失時期、皮膚科コンサルト状況、対症療法、その他副作用発現状況*

*Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 4.0

【検査値に関する項目】

炎症マーカー：CRP
血算：白血球、好中球、血小板、赤血球、好酸球
血圧

生化学：T-Chol、HDL、LDL、TG

肝機能指標：AST、ALT、ALP、ALB、T-Bil、 γ -GTP

腎機能指標：SCr、24h-CCr、BUN、尿酸

(倫理面への配慮)

- ② 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：

P-糖タンパク質の遺伝子上流約8kbに位置する824bp領域を3'端から欠失させ、転写活性をルシフェラーゼアッサイにより調べた。500までは欠失させてもTH応答性に変化は見られなかったが、373まで欠失させると約25%の応答性低下、325まで欠失させると約80%の応答性低下、さらに

276 までを欠失させると 85%の応答性低下を招いた。以上のことから、既報の TH 応答領域下流に新たな TH 応答領域が存在することが明らかとなった。この応答領域の配列を検索したところ、TH 受容体結合領域は存在しないことが判明した。また、上流の TH 応答領域単独および今回新たに見出した TH 応答領域単独では TH 応答性を示さない。従って TH 応答性は上流の TH 応答領域 (TH 受容体結合領域有り) と下流の TH 応答領域 (TH 受容体結合領域無し) が相互に関連し合って発揮されるものと推定される。さらに、ルシフェラーゼアッセイ欠失変異体の欠失領域に対応する①②③の領域をプローブとして Caco-2 nuclear extract を用いてゲルシフトアッセイを行った。それぞれに、特異的に結合する核タンパクが見出された。そこで、様々な変異を入れた competitor を用いたアッセイにより、各種タンパクの結合領域および結合に必須の配列を絞り込んだ。ゲルシフトアッセイにより判明した核タンパク結合部位に、結合阻害を生じる変異を導入し、Caco-2 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、次のことが明らかとなった。

1. 核蛋白の結合阻害を生じる変異を導入するといずれも TH 応答性の低下が見られた。このことから各核タンパク結合と転写活性はリンクしていると考えられる。

2. 各核タンパクの結合はそれぞれ転写活性に及ぼす影響力に差が有る。

3. 複数の核蛋白結合領域に変異を導入すると単独で導入した場合に比べて TH 応答性がより低下することから、各核タンパクの結合は相加的に転写活性に影響を及ぼすと考えられる。

以上の結果より、MDRI の甲状腺ホルモン (TH) による発現誘導には、上流約 8kb に位置する核内受容体結合領域に加えて、その下流にある領域が必須であり、この領域には複数の核タンパクの結合が見られた。それら核タンパクの結合を阻害する変異をルシフェラーゼコンストラクトに導入し、アッセイした結果、転写活性化能の低下が見られた。このことは、この領域に結合する核タンパクが、TH による誘導に関する事を示すものである。

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：

網羅的な文献検索の結果 146 例の相互作用情報が収集され、うち血中 AUC の 2 倍以上の上昇を伴うものは 34 例、5 倍以上の上昇を伴うものは 16 例であった。そのうち、少なくとも 1 つ以上の基質に対して AUC を 1.25 倍以上に上昇させる臨床事例が報告されている阻害剤を解析対象とした(計 69 例)。研究方法に記載したとおり、false-negative な予測を避けるためにある程度の過大評価を許した予測方法に基づき、これらの臨床事例について基質の血中 AUC の上昇率を予測した結果、2 倍以上の強い相互作用が見られる例では、ほとんどの場合で過小評価を避けることができた。AUC 変動率の予測精度としては、解析対象とした相互作用のうち 73%が報告値の 2 倍以内に予測されたことが確認された。続いて、予測計算に用いた仮定を検証するため、取り込みトランスポーターの阻害のみを考えた場合と、代謝・排泄トランスポーター機能の阻害のみを考えた場合の予測性の比較を行ったところ、取り込みトランスポーターに対する阻害のみを考慮した場合により精度良い予測ができることが

確認された。また、予測計算に用いる阻害剤濃度として、肝臓入口における血中最大蛋白非結合型濃度の予測値、全身血中の最大非結合型濃度、全身血中の最大濃度を用いた場合の比較を行ったところ、肝臓入口における血中最大蛋白非結合型濃度の予測値を用いることで、最も精度良い予測ができることが確認された。

in vitro 実験における阻害強度を元にした簡便な予測法によって、2 倍以上の強い相互作用が見られる例では、ほとんどの場合で過小評価を避けることができた。肝クリアランス変動の影響を予測する際には、肝取り込み過程に対する阻害効果を評価したほうが、肝代謝や胆汁排泄過程に対する効果を評価した場合よりも予測精度が高くなることが示されたことから、OATP の基質となる化合物では、一般に取り込み過程が肝クリアランスの決定要因であることが示唆された。また、肝取り込みトランスポーターに対する阻害効果を評価する際、肝臓入り口で予測される最大非結合型濃度を用いた場合に予測精度が最も良くなることから、肝臓トランスポーターを介した相互作用を評価する際に、肝臓入り口での最大濃度の予測法を用いることが出来ることが示唆された。一方、AUC 上昇率の過大評価を許した計算法を用いたにもかかわらず、いくつかの相互作用報告については過小評価を行ってしまったことから、基質のクリアランスについて取り込み律速の仮定が必ずしも成り立たない可能性や、これまで認知されていない新たな相互作用標的が存在している可能性が考えうる。

以上の結果より、OATP 基質が関与する薬物間相互作用のうち、2 倍以上の強い相互作用が関与する例について、*in vitro* 実験を元にする簡便な予測法によって過小評価を避け

た予測を行うことができた。創薬の初期段階で、得られている情報が限られている場合でも、この予測法を応用することで相互作用の強度が半定量的に予測可能となり、相互作用試験の必要性を議論するうえで有用な方法となると期待される。

3. 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：

(A) ソラフェニブ

解析対象 91 例中、HFS を発現したのは 61 例 (grade1 : 22 例、grade2 : 24 例、grade3 : 15 例) であった。HFS 発現日数中央値は 14 日 (範囲 : 1-384 日) であり、grade ごとの発現日数に有意な差は認められなかった。HFS による休薬は 18 例、HFS による治療中止は 4 例であった。

HFS 非発現群 (grade0) と HFS 発現群 (grade1-3) の患者背景と治療背景について群間比較した結果、性別、治療レジメン (CDDP-TAI 併用の有無)、喫煙歴、飲酒歴による HFS 発現割合の差は認められなかったが、年齢、がん種、開始投与量による有意な差が認められた。治療レジメンについては、有意差が見られなかったものの、肝動注併用全例が HFS 発現例であった。また、服用開始時における指導を入院で実施した場合と、外来で実施した場合での HFS 発現を比較したところ、有意な差は認められなかった。保湿剤の予防処方の有無においては、HFS の予防効果の差が認められなかった。HFS 発現に有意な差が認められた“疾患”について、腎細胞がん群と肝細胞がん群に分け、背景因子を比較したところ、性別、年齢では差が認められなかったが、開始投与量、入院の有無、予防処方の有無で

有意な差があった。また、両群間でHFSのgradeを比較したところ、肝細胞がんのほうが有意に高かった。

HFS発現と治療効果との関係については、治療効果が評価されている症例(78例)のうち最大治療効果が「進行(PD: progressive disease)」の症例は、HFS非発現群で22例中9例(41%)、発症群で56例中8例(14%)であり、HFSの発現と治療効果との間に有意な関連性が認められた。また、その他有害事象との相関については、ソラフェニブによる有害事象のうち、下痢、血圧上昇とHFSの関連性を調査した。血圧上昇については、降圧剤の追加処方があったものを有害事象ありとして解析した。HFS発現群61例中、下痢の発現は20例(33%)、血圧上昇は17例(28%)であり、HFS発現との相関は認められなかった。

以上の結果より、ソラフェニブによるHFS発現と患者背景及び治療背景の関連を検討した。その結果、年齢、疾患による差が認められた。疾患による差は、開始投与量の違いが関連していることが示唆された。適応上の投与量は、腎細胞がん及び肝細胞がんに対して同一の800mg/日であるが、泌尿器科では少ない投与量から開始する傾向にあった。泌尿器科では、外来にて保湿剤の予防処方をせずに投与を開始することが多く、一方、肝胆膵内科では入院にて患者教育をし、かつ保湿剤の予防処方をしてきたが、今回の調査で、保湿剤と患者教育の効果を評価するのに十分な情報は得られなかった。

HFS発現と治療効果が関連している可能性があることから、HFS症状を軽度に維持したまま、ソラフェニブを長く服用して

いけるように、症状悪化のリスクファクターや効果的な対処方法を探索することは重要な意味を持つ。HFSのリスクファクター探索において、後ろ向き調査から得られる知見はあったが、継続的なフォローアップから得られる、患者の生活習慣を含めたその他要因についても検討する必要があると考える。

(B) カペシタビン

HFS発現状況については、研究期間内に集積された診療情報は100症例であった。乳がんに対するカペシタビン治療レジメンはA法(3週1休, 1,650 mg/m²/day)及びB法(2週1休, 2,500 mg/m²/day)が承認されている。今回の調査症例では両レジメンが含まれていたが、HFS発現に対するレジメンの違いの影響は認められなかった(表1)。そこで、レジメンの違いを区別せず、HFSを発現しなかった患者集団(Grade 0群)、Grade 1のHFSを発現した患者集団(Grade 1群)とGrade 2以上のHFSを発現した患者集団(Grade 2&3群)に分類し、患者背景情報及び治療効果について以下の解析を行った。Grade 1、2及び3(最大Grade)のHFSを発現した症例はそれぞれ37例、33例及び3例であり、HFSの発現が認められなかったGrade 0の症例は27例であった。HFS発現時期及びHFS発現時のカペシタビン累積投与量については、Grade 1とGrade 2以上では明確な違いが認められ、Grade 2以上のHFSはGrade 1のHFSに比べてより早期に発現しており、累積投与量も少なかった。また、患者背景情報等については、Grade 0群とGrade 2&3群の患者背景について群間で比較した

結果、Grade 2&3 のカペシタビン投与期間は Grade 0 の群よりも有意に長いことが明らかとなった。また Grade 2&3 の群の下痢発現症例割合、口内炎発現症例割合は、Grade 0 の群に比して有意に高かった。HFS 発現と治療効果との関係（転移巣における奏効率）については、肝転移巣における治療効果が評価されている症例のうち最大治療効果が「進行（PD：progressive disease）」の症例は、Grade 0 群で 7 例中 4 例、Grade 2&3 群で 11 例中 1 例であり、HFS の発現と肝転移巣における治療効果との間に有意な関連性が認められた。また、肝以外の転移巣における治療効果が評価されている症例のうち最大治療効果が PD の症例は、Grade 0 群で 17 例中 5 例、Grade 2&3 群で 29 例中 2 例であり、Grade 0 群は Grade 2&3 群に比べ PD の症例が多い傾向を示した。なお、原発巣の治療効果に関しては、最大治療効果の情報が得られた例数が少ないため、統計的な解析は行わなかった。投与継続期間については、カペシタビン投与継続期間を群間で比較した結果、Grade 1 群、Grade 2&3 群ともに Grade 0 群に比べて有意に長いカペシタビン投与継続期間が観察された。また、Grade 1 群と Grade 2&3 群の間に違いは見られなかった。なお、カペシタビン投与中止理由は PD が大半を占めており、群間で特段の違いはみられていない。腫瘍マーカーについては、Grade 2&3 群の症例は Grade 0 群の症例に比べ、治療開始後の CEA、CA15-3 が低下する傾向が示唆され、HFS の好発時期である投与開始後 9 週目（63 日目）の CEA 及び CA15-3 変動率（変化なしを 1 とした場合）は、Grade 0 群に比べ Grade 2&3 群で

有意に低かった。

以上の結果から、HFS の発現に関連可能性のある患者背景因子を見出すことはできなかった。一方、HFS の発現と治療効果との関係については、以下の興味深い知見が得られた。

- Grade 2 以上の HFS を発現する患者では、HFS を発現しない患者に比べて肝転移巣における奏効率が高い
- HFS（Grade を問わず）を発現する患者では、HFS を発現しない患者に比べてカペシタビン投与継続期間が長い
- Grade 2 以上の HFS を発現する患者では、HFS を発現しない患者に比べて HFS 好発時期における腫瘍マーカー（CEA、CA15-3）が低下する傾向がある
- HFS 発現と他の副作用である下痢および口内炎発現とは相関しており、これらの副作用発現に関し、少なくとも一部のメカニズムは関連している可能性がある

これらの結果は、カペシタビンの治療効果と HFS の発現との間に相関がある可能性を示唆するものである。今後、この相関が確認されれば、カペシタビン治療のコンプライアンス/アドヒアランスを向上・維持の意義に関する有用な情報となり、また今後のカペシタビンによる治療法の進歩につながりし得るものと考えられることから、今後、より大規模な調査による検討が必要と考えられる。

D. 健康危険情報

該当無し

E. 研究発表

1. 論文発表

- Saeki M, Kurose K, Hasegawa R, Tohkin M. Functional analysis of genetic variations in the 5'-flanking region of the human MDR1 gene. *Molecular Genetics and Metabolism*. 102:91-98(2011).
 - Maekawa K, Harakawa N, Yoshimura T, Kim SR, Fujimura Y, Aohara F, Sai K, Katori N, Tohkin M, Naito M, Hasegawa R, Okuda H, Sawada J, Niwa T, Saito Y. CYP3A4*16 and CYP3A4*18 alleles found in East Asians exhibit differential catalytic activities for seven CYP3A4 substrate drugs. *Drug Metab Dispos*. 38:2100-2104 (2010).
 - Tohkin M, Ishihuro A, Kaniwa N, Saito Y, Kurose K, and Hasegawa R. Prediction of Severe Adverse Drug Reactions Using Pharmacogenetic Biomarkers. *Drug Metab. Pharmacokinet*. 25:122-133 (2010).
 - Kaniwa N, Saito Y, Aihara M, Matsunaga K, Tohkin M, Kurose K, Furuya H, Takahashi Y, Muramatsu M, Kinishita S, Abe M, Ikeda H, Kashiwagi M, Song Y, Ueta M, Sotozono C, Ikezawa Z, Hasegawa R. HLA-B*1511 is a risk factor for carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients. *JEpilepsia* 51:2461-2465, (2010).
 - Watanabe T, Kusuhara H, Sugiyama Y. Application of physiologically based pharmacokinetic modeling and clearance concept to drugs showing transporter-mediated distribution and clearance in humans. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 37:575-590 (2010)
 - Watanabe T, Kusuhara H, Watanabe T, Debori Y, Maeda K, Kondo T, Nakayama H, Horita S, Ogilvie BW, Parkinson A, Hu Z, Sugiyama Y. Prediction of the overall renal tubular secretion and hepatic clearance of anionic drugs and a renal drug-drug interaction involving OAT3 in humans by in vitro uptake experiments. *Drug Metab Dispos* in press.
2. 学会発表
- Masahiro Tohkin, Mayumi Saeki, Ryuichi Hasegawa, Yoshiro Saito, and Kouichi Kurose **EPIGENETIC REGULATION OF MDR1 GENE EXPRESSION** 第25回日本薬物動態学会年会（大宮）平成22年10月
- F. 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

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 第三室長
研究協力者 小泉 朋子 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 派遣研究員

研究要旨：*MDR1* 遺伝子によってコードされる排出トランスポーター、P-糖蛋白は、薬物体内動態に深く関与しており、核内受容体を介して発現誘導されることが知られている。本研究では、核内受容体による *MDR1* の発現誘導機構の解明を目的としており、我々は現在までに、*MDR1* の約 8kb 上流に核内受容体リガンド応答領域があり、この領域に核内受容体が結合し、*MDR1* の発現誘導を行うことを示してきた。今回さらに解析を進め、甲状腺ホルモン受容体による発現誘導に必須の新たな制御領域を発見し、その領域に結合する核タンパクが、甲状腺ホルモンによる *MDR1* の誘導に関与する事を示唆するデータを得た。

A. 研究目的

P-糖蛋白は消化管粘膜、腎尿細管上皮細胞、脳血管内皮細胞などに発現している薬物トランスポーターの一つであり、抗ガン剤、カルシウムチャネルブロッカーなど様々な化合物を細胞内から細胞外へと能動的に輸送し、異物の吸収抑制および排泄の促進に関与し、薬物の生体利用率や薬物の標的組織への分布に影響する。また、pregnane X receptor, vitamin D receptor (VDR), thyroid hormone receptor (TR) 等の核内受容体を介して発現誘導されることが知られている。本研究では、核内受容体による *MDR1* の発現誘導機構の解明を目的としており、我々は現在までに、*MDR1* の約 8kb 上流に核内受容体リガンド応答領域があり、この領域に核内受容体が結合し、*MDR1* の発現誘導を行うことを示してきた。今回さらに解析を進め、甲状腺ホルモン (TH) 受容体による発現誘導に必須の新たな制御領域を発見し、その領域に関する解析を行った。

B. 研究方法

Mutant の作成

MDR1 の発現制御領域の欠失変異体の作成は wild-type を基に In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit (クロンテック) を用いて行った。その他の変異の導入には 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 Synthetic poly(A)signal/transcriptional pause site から SV40 late poly(A) signal までの範囲について、変異導入部以外すべて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。

ルシフェラーゼアッセイ

Caco-2 細胞を 1.8×10^4 cells/well になるよう 10% FBS-DMEM 中で調整し、96 穴プレートに播種し、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養した。ホタル ルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に *MDR1* 遺伝子の転写制御領域を連結したレポータープラスミド (100 ng)、核内受容体発現プラスミド (10 ng)、ウミシイタケ ルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミド (10 ng)、トランスフェクション試薬 HilyMax (Dojindo) をプロトコールに従い細胞へ添加し、遺伝子導入を行った。24

時間後、甲状腺ホルモン (T3) を添加し、その 3.5 時間後に、細胞内に発現しているルシフェラーゼの酵素活性を Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) により化学発光として測定した。トランスフェクション効率は、コトランスフェクションしたウミシイタケ 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

5'末端を FITC ラベル化したオリゴヌクレオチドをプライマーとして当該領域を PCR 法により増幅し、精製後、プローブとして用いた。1 μ L の 5x binding buffer (15 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 50% glycerol, 100 mM HEPES, pH 7.8), 0.5 μ L の 1 mg/mL poly(dI-dC), 0.5 μ L の 0.33 μ M FITC 標識プローブを混合した。最後に Caco-2 の核抽出液タンパクを 5 μ g 加え、20 分間室温で反応した。サンプルは 6% Long Ranger ゲル (Lonza) と 0.5X TBE バッファーを用いて DSQ-2000L で電気泳動した。

C. 研究結果および考察

新たな TH 応答領域の発見

上流約 8kb に位置する 824 bp 領域を 3' 端から欠失させ、転写活性をルシフェラーゼアッセイにより調べた (図 1)。500 までは欠失させても TH 応答性に変化は見られなかったが、373 まで欠失させると約 25% の応答性低下、325 までを欠失させると約 80% の応答性低下、さらに 276 までを欠失させると 85% の応答性低下を招いた。以上のことから、既報の TH 応答領域 (図 1 の -7880~-7817 領域) 下流に新たな TH 応答領域が存在することが明らかとなった。この応答領域の配列を検索したところ、TH 受容体結合領域は存在しないことが判明した。また、上流の TH 応答領域単独および今回新たに見出した TH 応答領域単独では TH 応答性を示さない。従って TH 応答性は上流の TH 応答領域 (TH 受容体結合領域有り) と下流の TH 応答領域 (TH 受容体結合領域無し) が相互に関連し合って発揮されるものと推定される。

新 TH 応答領域に結合する核タンパク質

図 2 に示すように、ルシフェラーゼアッセイ欠失変異体の欠失領域に対応する①②③の領域をプローブとして Caco-2 nuclear extract を用いてゲルシフトアッセイを行った。それぞれに、特異的に結合する核タンパクが見出された。そこで、様々な変異を入れた competitor を用いたアッセイにより、各種タンパクの結合領域および結合に必須の配列を絞り込んだ (data not shown)。

各核蛋白結合領域が転写活性に及ぼす影響

ゲルシフトアッセイにより判明した核タンパク結合部位に、結合阻害を生じる変異を導入し、Caco-2 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行った (図 3)。その結果、次のことが明らかとなった。

1. 核蛋白の結合阻害を生じる変異を導入するといずれも TH 応答性の低下が見られた。このことから各核タンパク結合と転写活性はリンクしていると考えられる。
2. 各核タンパクの結合はそれぞれ転写活性に及ぼす影響力に差が有る。
3. 複数の核蛋白結合領域に変異を導入すると単独で導入した場合に比べて TH 応答性がより低下することから、各核タンパクの結合は相加的に転写活性に影響を及ぼすと考えられる。

E. 結論

MDR1 の甲状腺ホルモン (TH) による発現誘導には、上流約 8kb に位置する核内受容体結合領域に加えて、その下流にある領域が必須であり、この領域には複数の核タンパクの結合が見られた。それら核タンパクの結合を阻害する変異をルシフェラーゼコンストラクトに導入し、アッセイした結果、転写活性化能の低下が見られた。このことは、この領域に結合する核タンパクが、TH による誘導に関与する事を示すものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

Maekawa K, Harakawa N, Yoshimura T, Kim SR, Fujimura Y, Aohara F, Sai K, Katori N, Tohkin M, Naito M, Hasegawa R, Okuda H, Sawada J, Niwa T, Saito Y. **CYP3A4*16 and CYP3A4*18 alleles found in East Asians exhibit differential catalytic activities for seven CYP3A4 substrate drugs.** *Drug Metab Dispos.* **38**, 2100-4(2010).

Saeki M, Kurose K, Hasegawa R, Tohkin M. **Functional analysis of genetic variations in the 5'-flanking region of the human MDR1 gene.** *Molecular Genetics and Metabolism* **102**, 91-98 (2011).

Tohkin M, Ishihuro A, Kaniwa N, Saito Y, Kurose K, and Hasegawa R. **Prediction of Severe Adverse Drug Reactions Using Pharmacogenetic Biomarkers** *Drug Metab. Pharmacokinet* **25**, 122-133 (2010)

Kaniwa N, Saito Y, Aihara M, Matsunaga K, Tohkin M, Kurose K, Furuya H, Takahashi Y, Muramatsu M, Kinoshita S, Abe M, Ikeda H, Kashiwagi M, Song Y, Ueta M, Sotozono C, Ikezawa Z, Hasegawa R
HLA-B*1511 is a risk factor for carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients. *Epilepsia* **51**, 2461-2465 (2010)

2. 学会発表

Masahiro Tohkin, Mayumi Saeki, Ryuichi Hasegawa, Yoshiro Saito, and Kouichi Kurose **EPIGENETIC REGULATION OF MDR1 GENE EXPRESSION**
第25回日本薬物動態学会年会（大宮）平成22年10月

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

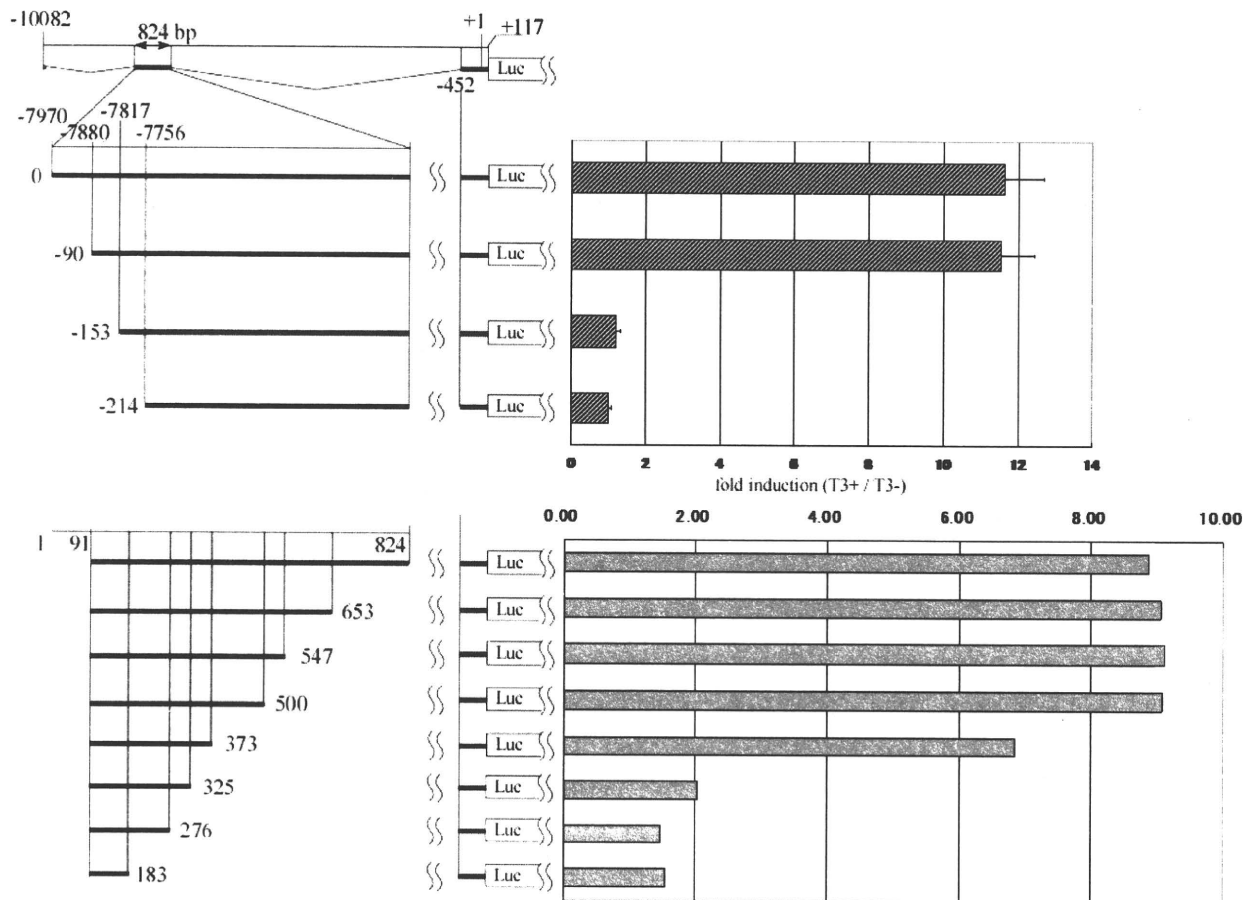


図1 MDR1 遺伝子上流約 8 k b にある 824bp 領域の欠失変異体-Luc constructs を Caco-2 細胞に一過性トランスフェクションし、T3 による転写誘導能を解析した。左側部分が欠失変異体を、右側部分が T3 による転写活性誘導能を示した。

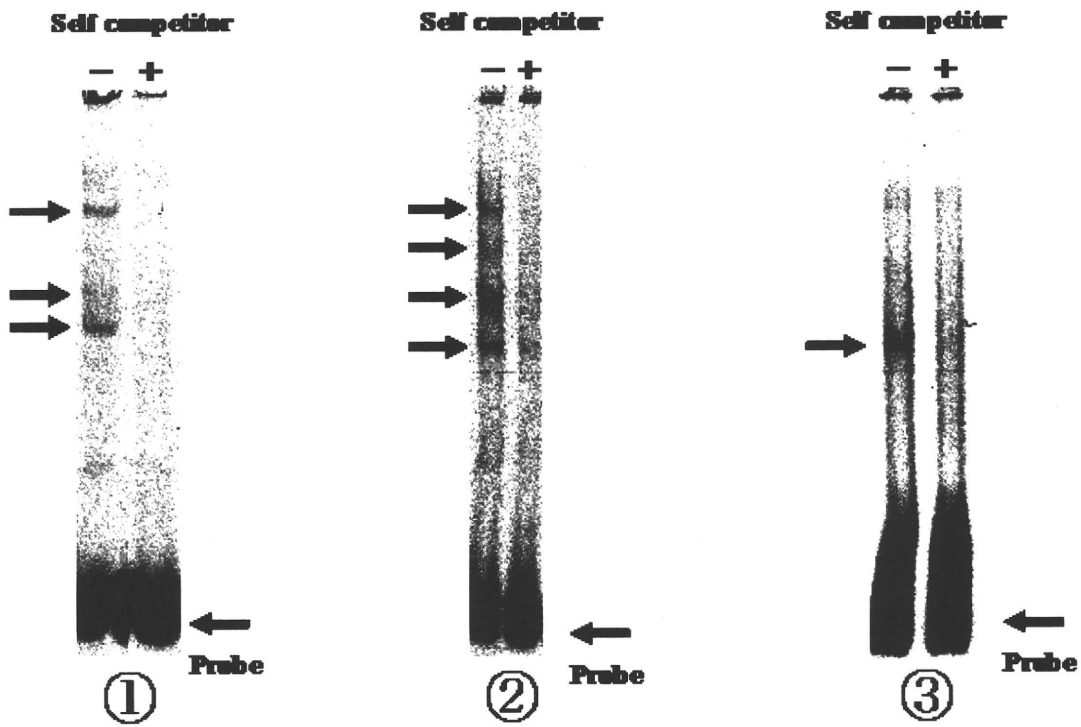
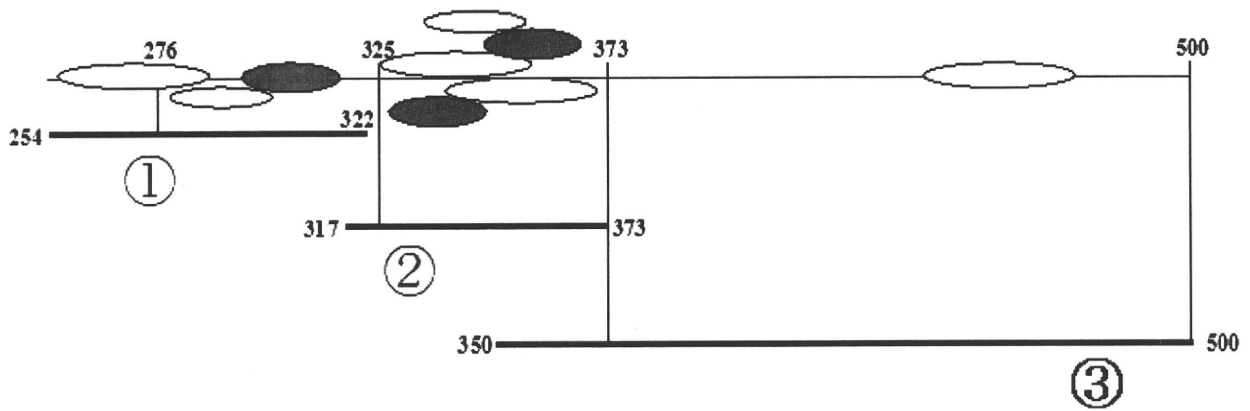


図2 TH 応答領域のDNA断片への Caco-2 核蛋白結合をゲルシフトアッセイにより解析した。上段に核蛋白の結合を模式的に示した。下段はゲルシフトアッセイの結果を示した。

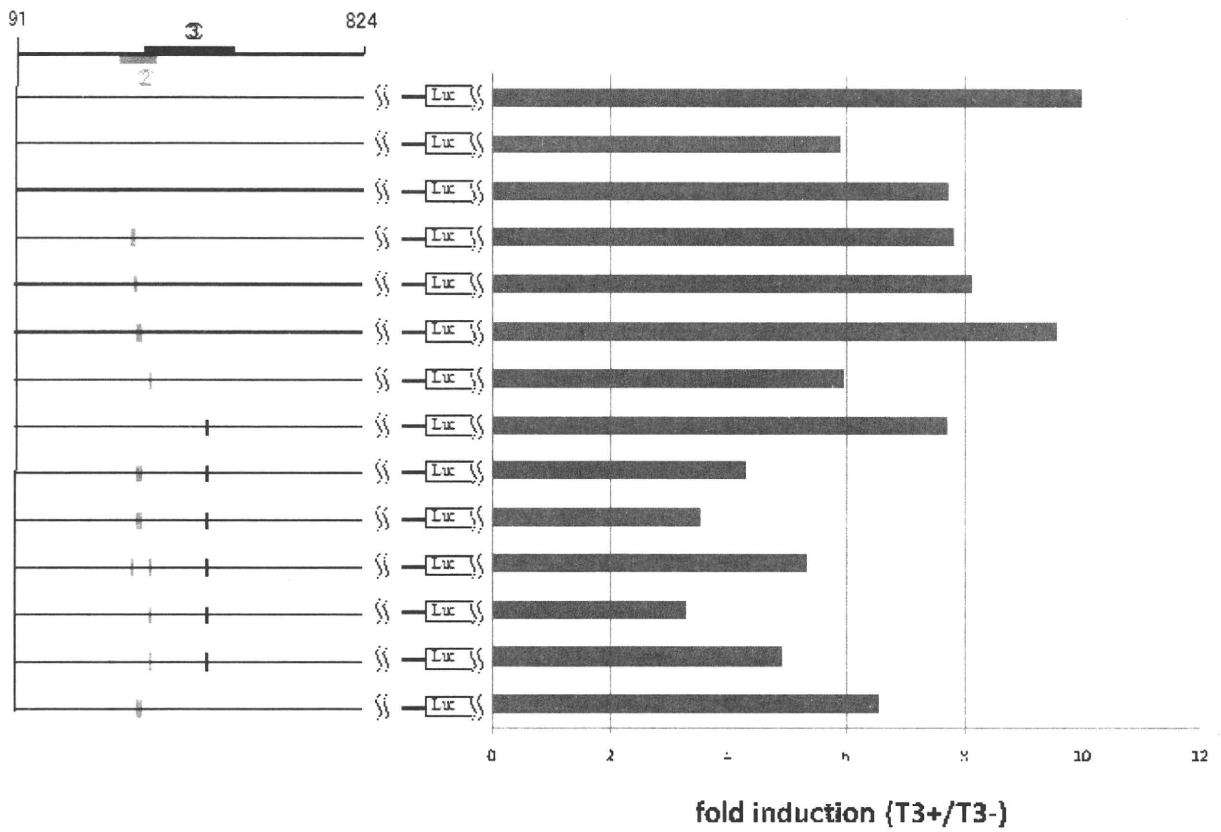


図 3 核蛋白結合部位に変異を導入して T3 による転写誘導能を解析した。左側に変異導入部位、右側部分が T3 による転写活性誘導能を示した。

研究分担報告書

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 トランスポーターが関与する臨床薬物間相互作用の情報を収集し、それらの強度を *in vitro* 試験系の結果から予測する研究を行った。 *in vitro* 阻害実験の結果とクリアランスモデルに基づく簡便な予測法により、2 倍以上の強い相互作用を伴う例については、殆どの場合で過小評価を避けた予測を行うことができた。全体の予測精度としては、血中 AUC の変動率について、73%の例が 2 倍以内の精度で予測された。この際に用いた計算上の仮定を検証するため、先に用いた取り込みトランスポーターの阻害のみを考慮した予測法と、代謝・排泄トランスポーター機能の阻害のみを考慮した場合との比較を行った。結果、取り込みトランスポーターの阻害のみを考慮した方が精度良い予測ができることが確認され、これら OATP 基質の薬物動態における OATP 類の重要性が示唆された。また、計算に使用した阻害剤濃度の妥当性を検証するため、三種の阻害剤濃度を用いて相互作用の予測性の比較を行った結果、肝臓入り口での最大非結合型濃度を用いることで最も精度良い予測ができることが確認された。この予測法を適用することで、相互作用の強度が半定量的に予測可能となり、重篤な結果をもたらす相互作用を回避することが可能である。

A. 研究目的

近年、医薬品体内動態における薬物トランスポーターの重要性が明らかにされ、薬物トランスポーターが関連した薬物間相互作用の実例も報告されている。また、従来、代謝が主排泄経路となる薬物の肝取り込みは単純拡散と考えられてきたが、atorvastatin など肝取り込みに OATP が関与している例も見いだされている。このようにトランスポーターおよび代謝酵素により排泄される薬物のケースにおいて、個々の過程における相互作用が、血中動態にどの程度影響を与えるのか予測するための方法論の開発は必要不可欠である。

H20・21 年度において、スタチン系薬剤をモデル薬物として用いて、その血中動態は主に取り込み能力により主に決定され、有害作用の発症リスクに関連していることを明らかにした。本研究では、肝臓の取り込みトランスポーター OATP (Organic anion transporting polypeptide) によって肝取り込みされる 12 種の有機アニオン系薬物に着目し、それらが被相互作用薬となる臨床での薬物間相互作用の強度を、*in vitro* 実験の結果を用いて統一された方法に基づき定量的に予測することを目指した。

B. 研究方法

肝臓の取り込みトランスポーター OATP によって肝臓内にとりこまれることが知られている有機アニオン系薬物である atorvastatin,

pravastatin, rosuvastatin, fluvastatin, pitavastatin, cerivastatin, repaglinide, nateglinide, glibenclamide, glimepiride, irbesartan, telmisartan の 12 化合物が関与する薬物間相互作用の事例を網羅的な文献検索により収集した。続いて、対象とした各基質について、トランスポーターや代謝酵素の基質認識に関する情報や各基質のヒトにおける臨床薬物動態パラメータを収集し、以後の計算に必要なパラメータをさらに算出した。また、阻害剤側の薬物動態パラメータや各代謝酵素・トランスポーター分子に対する阻害定数なども同様に収集した。さらに、文献情報により阻害実験に関する情報を確認できなかった化合物のうち、以後の相互作用の解析に必要となる代謝酵素やトランスポーターに対する阻害定数については、*in vitro* 実験を新たに行うことで取得した。

相互作用強度の予測計算を行う際には、まず基質化合物の消化管アベイラビリティと臓器固有クリアランスを、過去の報告より収集された薬物動態パラメータより、クリアランスコンセプトと dispersion model によって算出した。肝臓と腎臓の固有クリアランスの阻害を考慮する際には、阻害剤による競合阻害を仮定して固有クリアランスの変動率を予測した上で、dispersion model によって臓器クリアランスの変動率を算出した。また、肝臓・腎臓における薬物消失では、H20・21 年度の成果に基づき、肝取り込みトランスポーターによる輸送が、全

体の固有クリアランスの律速段階を担っていると考え、代謝酵素や apical 側の排出トランスポーターの阻害は血中 AUC には影響を与えないものとして計算を行った。また、in vitro 系によって予期されなかった相互作用が臨床で発生することを防ぐため、今回の予測法では、肝取り込みトランスポーターに対する阻害を評価する際において用いる阻害剤の濃度は阻害剤の肝臓入口における血中最大蛋白非結合型濃度の予測値を、腎取り込みトランスポーターに対しては、循環血中最大蛋白非結合型濃度を用いて計算した。一方で、消化管における薬物間相互作用の予測においては、小腸の代謝酵素阻害では DIN (drug interaction number: Dose / K_i 値) が 2.8 L を超えた場合、排出トランスポーターの阻害では 10.8 L を超えた場合に消化管における相互作用が起ると考え、その場合には、FaFg が最大値である 1 にまで上昇すると仮定して計算した。以上のように、false-negative な予測を避けるためにある程度の過大評価を許した予測方法に基づき、基質の血中 AUC の上昇率を予測した。

C. 研究結果

網羅的な文献検索の結果 146 例の相互作用情報が収集され、うち血中 AUC の 2 倍以上の上昇を伴うものは 34 例、5 倍以上の上昇を伴うものは 16 例であった。そのうち、少なくとも 1 つ以上の基質に対して AUC を 1.25 倍以上に上昇させる臨床事例が報告されている阻害剤を解析対象とした (計 69 例)。研究方法に記載したとおり、false-negative な予測を避けるためにある程度の過大評価を許した予測方法に基づき、これらの臨床事例について基質の血中 AUC の上昇率を予測した結果、2 倍以上の強い相互作用が見られる例では、ほとんどの場合で過小評価を避けることができた。AUC 変動率の予測精度としては、解析対象とした相互作用のうち 73% が報告値の 2 倍以内に予測されたことが確認された。

続いて、予測計算に用いた仮定を検証するため、取り込みトランスポーターの阻害のみを考えた場合と、代謝・排泄トランスポーター機能の阻害のみを考えた場合の予測性の比較を行ったところ、取り込みトランスポーターに対する阻害のみを考慮した場合により精度良い予測ができることが確認された。また、予測計算に用いる阻害剤濃度として、肝臓入口における血中最大蛋白非結合型濃度の予測値、全身血中の最大非結合型濃度、全身血中の最大濃度を用いた場合の比較を行ったところ、肝臓入口における血中最大蛋白非結合型濃度の予測値を用いることで、最も精度良い予測ができることが確認された。

D. 考察

in vitro 実験における阻害強度を元にした簡便な予測法によって、2 倍以上の強い相互作用が見られる例では、ほとんどの場合で過小評価を避けることができた。肝クリアランス変動の影響を予測する際には、肝取り込み過程に対する阻害効果を評価したほうが、肝代謝や胆汁排泄過程に対する効果を評価した場合よりも予測精度が高くなること示されたことから、OATP の基質となる化合物では、一般に取り込み過程が肝クリアランスの決定要因であることが示唆された。また、肝取り込みトランスポーターに対する阻害効果を評価する際、肝臓入り口で予測される最大非結合型濃度を用いた場合に予測精度が最も良くなることから、肝臓トランスポーターを介した相互作用を評価する際に、肝臓入り口での最大濃度の予測法を用いることが出来ること示唆された。

一方、AUC 上昇率の過大評価を許した計算法を用いたにもかかわらず、いくつかの相互作用報告については過小評価を行ってしまったことから、基質のクリアランスについて取り込み律速の仮定が必ずしも成り立たない可能性や、これまで認知されていない新たな相互作用標的が存在している可能性が考えうる。

E. 結論

OATP 基質が関与する薬物間相互作用のうち、2 倍以上の強い相互作用が関与する例について、in vitro 実験を元にする簡便な予測法によって過小評価を避けた予測を行うことができた。創薬の初期段階で、得られている情報が限られている場合でも、この予測法を応用することで相互作用の強度が半定量的に予測可能となり、相互作用試験の必要性を議論するうえで有用な方法となると期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Watanabe T, Kusahara H, Sugiyama Y. Application of physiologically based pharmacokinetic modeling and clearance concept to drugs showing transporter-mediated distribution and clearance in humans. J Pharmacokinet Pharmacodyn 37:575-90, 2010
2. Watanabe T, Kusahara H, Watanabe T, Debori Y, Maeda K, Kondo T, Nakayama H, Horita S, Ogilvie BW, Parkinson A, Hu Z, Sugiyama Y. Prediction of the overall renal tubular secretion and hepatic clearance of anionic drugs and a renal drug-drug interaction

involving OAT3 in humans by in vitro uptake experiments. Drug Metab Dispos, *in press*

H.知的財産権の出願・登録状況
なし