

(<http://unstats.un.org/unsd/methods/m49/m49regin.htm>) に従った。

## (2) *in vitro* 評価系を用いた、フェニトイン共有結合性に関する遺伝子多型影響の検討

対象とするモデル薬物は、薬疹や肝障害が副作用として報告されているフェニトインとした。<sup>14</sup>C で標識した各化合物は日本アイソトープ協会(東京)から購入した。各シトクロム P450 分子種のタンパク質を発現したマイクロソーム画分、ヒト肝細胞のマイクロソーム画分(CYP2C9 および CYP2C19 の遺伝子型が明示)、および NADPH regenerating system は、日本 BD Gentest 社(東京)より購入した。

アッセイ系では、0.2 mM フェニトイン (111 KBq)、NADPH regenerating system を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 37°C で 5 分加温後、マイクロソーム画分を加え、攪拌後、37°C で 60 分間インキュベートした。氷冷後、100,000 x g で 60 分間 (4°C) 遠心し、その沈殿からタンパク質を抽出して、SDS-PAGE を行った。電気泳動後のゲルを PVDF 膜に転写後、放射性同位体検出用プレート (BAS-MS2040 または BAS-TR2040、GE Healthcare 社、東京) への露光を行い、BAS2500 にて読み取りを行った。

### (倫理面での配慮)

本研究のうち、論文調査によるアレル頻度解析に関しては、該当しない。また、*in vitro* 評価系に関しては、市販のヒト肝臓のマイクロソーム画分を用いたが、インフォームドコンセントを取得して採取された正当な試料であることを機関倫理審査委員会で認定されているものであり、倫理審査委員会の新たな承認は不要であった。

## C. 研究結果:

### (1) 主要薬物動態関連遺伝子の機能多型におけるアレル頻度の民族差

#### 1. CYP2A6\*4 (図 1)

CYP2A6 は、抗がん剤テガフル、アロマトーゼ阻害薬フェドロゾール等の代謝に関わる酵素であり、この多型のうち、全欠損型の\*4 は、抗がん剤テガフルの有効性低下との関連が示唆されている。

日本人における CYP2A6\*4 の MAF が 0.200 であったのに対し、韓国人では 0.110、中国人(漢民族)では 0.086 であり、日本人と中国人の間で、設定した基準値以上の差 (0.114) が認めら

れた。

一方、欧州の 2 地域(西・南)の\*4 頻度は 0.036 ~ 0.038 であり、欧州地域内における基準値以上の頻度差は認められなかった。

従って、CYP2A6\*4 は、東アジア地域内(日本と中国間)において、設定した基準値以上かつ 2 倍以上 (2.32 倍) の差があり、欧州地域内の頻度差と比較して、民族差が大きいと考えられた。

#### 2. CYP2B6\*4, \*5, \*6, \*18

CYP2B6 は、エイズ治療薬エファビレンツや、抗がん剤シクロホスファミド等の代謝に関与する。機能変化をもたらす多型として、\*4 [785A>G (Lys262Arg)、活性上昇]、\*5 [1459C>T (Arg487Cys)、上昇または低下]、\*6 [516G>T (Gln172His) 及び 785A>G (Lys262Arg)、活性低下]ならびに\*18 [983T>C (Ile328Thr)、活性低下]が知られており、特に\*6 は HIV 治療薬の血中濃度上昇との関連についての多くの報告がある。

日本人における\*4 ハプロタイプの MAF は 0.082 であり、韓国人 (MAF=0.058)、中国人(漢民族、0.072)、台湾人(漢民族、0.124)との間に、基準値以上の頻度差は認められなかった。また\*6 ハプロタイプにおいても、日本人の MAF が 0.180 であるのに対し、韓国人で 0.137、中国人で 0.201、台湾人で 0.158 と、いずれも基準値以内であった。なお、\*5 ハプロタイプの日本人頻度は、0.011 であり、他の東アジア諸民族においても頻度は非常に低く (MAF=0.00 ~ 0.018)、民族差は認められなかった。また、\*18 については、日本人及び東アジア諸民族において検出されていない。

欧州 3 地域(西・南・北)内では、\*4 (MAF=0.022 ~ 0.061) と \*6 (MAF=0.217 ~ 0.282) の頻度差は認められなかった。欧州 3 地域における\*5 の頻度 (MAF=0.109 ~ 0.122) において、基準値以上の頻度差は見られなかったが、その平均 MAF は、日本人の 10 倍以上であった。なお、\*18 については、欧州でも検出されていない。

これらの結果より、日本人と他の東アジア民族間で、4 種の機能多型での頻度差は認められなかった。

#### 3. FM03

FM03 は、肝マイクロソーム画分に発現し、含窒素、含硫黄医薬品(消炎・鎮痛薬スリダク、抗真菌薬ボリコナゾール等)の N-, S-酸化反応に関わる。日本人に比較的多くみられる活性低下をもたらす機能多型として、472G>A (Glu158Lys) 及び 923A>G (Glu308Gly) があり、

スリンダクによる大腸腺腫抑制効果との関連も報告されている。

日本人の *FMOS* 472G>A (Glu158Lys) および 923A>G (Glu308Gly) の頻度は、それぞれ 0.234 および 0.204 であり、韓国人 (MAF=0.185 および 0.174)、中国人 (漢民族、0.237 および 0.165) との間で、設定した基準値以上の差は認められなかった。

一方、欧州 3 地域 (西・南・北) では、472G>A (Glu158Lys) および 923A>G (Glu308Gly) とともに地域内で基準値以上の頻度差が認められた。すなわち、472G>A (Glu158Lys) では、北 (MAF=0.435) と西 (0.285) 地域間で 0.150 の差が、923A>G (Glu308Gly) では、北 (MAF=0.220) と南 (0.114) 地域間で 0.106 の差が、それぞれ認められた。しかし、その程度は何れも 2 倍未満であった。

以上のことから、*FMOS* の 2 種の多型頻度について、東アジア地域内では民族差は認められないこと、一方で、欧州地域内での地域差は認められるものの、その程度は 2 倍未満と小さいこと、が明らかとなった。

#### 4. *ABCB1* (P-gP) 1236C>T (Gly412Gly)、2677G>T (Ala893Ser)、2677G>A (Ala893Thr)、3435C>T (Ile1145Ile) (図 2)

*ABCB1* (P-gP) は、肝臓、小腸、腎臓、血液脳関門等に発現し、細胞内からの化合物の排出に関与するトランスポーターであり、ジゴキシン、シクロスポリン等の脂溶性の高い塩基性・中性の医薬品が幅広く基質となる。最も良く知られる多型として、mRNA の安定性低下を伴う 3435C>T (Ile1145Ile) があり、十二指腸における発現低下、ジゴキシン血中濃度上昇との関連が報告された後、これと連鎖する 1236C>T (Gly412Gly) や 2677G>T (Ala893Ser) との組み合わせ (ハプロタイプ) や、アジア人に見られる 2677G>A (Ala893Thr) による薬物応答性への影響が報告されている。

*ABCB1* 1236C>T については、日本人の頻度は 0.606 であり、中国人 (漢民族、MAF=0.639) および台湾人 (0.633) との頻度差は認められなかった。一方、韓国人 (0.726) とは設定した基準値以上の頻度差 (0.120) が認められたが、その頻度比は約 1.2 であった。

2677G>T (Ala893Ser) については、日本人の頻度は 0.396 であり、韓国人 (MAF=0.384)、中国人 (漢民族、0.424) および台湾人 (0.379) との差はみられなかった。また 2677G>A (Ala893Thr) でも、日本人の頻度 (MAF=0.177) と、韓国人 (0.121)、中国人 (漢民族、0.147)、

台湾人 (0.099) の頻度と類似していた。

3435C>T (Ile1145Ile) については、日本人の頻度は 0.425 と、韓国人 (MAF=0.425) と同じであり、また中国人 (漢民族、0.396) とも類似していた。一方で台湾人 (0.600) とは基準値以上の頻度差 (0.175) がみられたが、日本人との頻度比は約 1.4 であった。

欧州 4 地域においては、何れの機能多型についても頻度に地域差は見られなかった。

以上の結果から、1236C>T については日韓間で、3435C>T では日台間で、それぞれ基準値以上の差が認められたが、それぞれ 1.2 倍、1.4 倍の違いと頻度比は小さなものであった。

#### 5. *ABCB11* (BSEP) 1331T>C (Val444Ala)

*ABCB11* (BSEP) は、肝臓の胆管側に発現し、胆汁酸やエストロジオール-17β-D-グルクロニド、抗がん剤パクリタキセルや高脂血症薬プラバスタチン等の胆汁排出に関与している。また薬剤性胆汁うっ滞と *ABCB11* 多型との関連も示唆されている。発現低下をもたらす多型に 1331T>C (Val444Ala) が知られている。

日本人の 1331T>C (Val444Ala) 頻度は 0.765 であり、報告が存在した中国人 (漢民族、MAF=0.722) との差は見られなかった。欧州 4 地域内の頻度 (MAF=0.542~0.580) においても基準値以上の差は認められなかった。

以上の結果から、*ABCB11* 1331T>C (Val444Ala) 多型につき、日本人と他の東アジア民族間で、基準値以上の頻度差は認められなかった。

#### 6. *SLC22A2* (OCT2) 808G>T (Ala270Ser)

*SLC22A2* (OCT2) は、腎近位尿細管の血管側の側底膜に発現し、カチオン性薬物の血中から腎組織中への移行に関与しており、糖尿病薬メトホルミン等の輸送に関わっている。活性低下をもたらす多型として、808G>T (Ala270Ser) があり、メトホルミン腎クリアランスへの影響の可能性が示唆されている。

*SLC22A2* (OCT2) 808G>T (Ala270Ser) 多型の日本人頻度は 0.105 であり、中国人 (漢民族) (MAF=0.124) 及び韓国人 (0.099) との間に民族差は見られなかった。さらに、欧州 2 地域 (西および南、MAF はそれぞれ 0.092 と 0.142) において、頻度 0.05 の差が認められたが、その比は 1.54 と比較的小さなものであった。

以上の結果から、*SLC22A2* 808G>T (Ala270Ser) 多型につき、日本人と他の東アジア民族間で、基準値以上の頻度差は認められなかった。

(2) *in vitro* 評価系を用いた、フェニトイン共有結合性に関する遺伝子多型影響の検討

まず各 P450 分子種 (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5) を発現させたマイクロソーム画分を用いて、NADPH 添加または非添加の条件下で <sup>14</sup>C-フェニトインと反応させた沈殿画分から得られた抽出タンパク質を対象に解析した結果、CYP2C19, CYP3A4, および CYP3A5 で、約 55 kDa 付近にバンドが検出された。これらは、昨年度、初代培養肝細胞を用いた実験で認められた 2 本のバンドの下のバンドの分子量と類似し、<sup>14</sup>C-フェニトインが共有結合したアダクトタンパク質と推定された。

さらに、CYP2C9\*2/\*3 または CYP2C9\*3/\*3 (以上、CYP2C9 活性低下型ホモ接合) または CYP2C19\*2/\*2 (CYP2C19 活性欠損型ホモ接合) と、これら分子種の野生型のヒト肝マイクロソーム画分を用いて、フェニトインアダクトタンパク質生成における遺伝子多型影響を検討した。野生型マイクロソームと CYP2C9 の活性低下型マイクロソームでは、分子量 55 kDa 付近と 52 kDa 付近にバンドが認められたが、CYP2C19 の活性欠損型マイクロソームでは、いずれの分子量のバンドもレベルの低下が認められ、特に下の約 52 kDa のバンドは、ほぼ消失した(図 3)。

以上の結果から、フェニトイン反応性代謝物によるタンパク質アダクト生成には、CYP2C19 と CYP3A (3A4 と 3A5) が関与すること、CYP2C19 の活性欠損型では、アダクト生成が進みにくいこと、副作用が起こりにくいことが示唆された。

#### D. 考察

(1) 主要薬物動態関連遺伝子の機能多型におけるアレル頻度の民族差

今回調査対象とした遺伝子多型において、欧州 4 地域では、*FMO3* 多型及び *SLC22A2* 多型に関して、設定した基準値以上の頻度差が認められたが、その差は比較的小さいもの (2 倍以内) であり、また他の多型に関しても頻度差が小さいことが明らかとなった。

一方、日本人と他の東アジア人の間で、設定した基準以上の差が認められた多型として、*CYP2A6*\*4 (中国人との間)、*ABCB1* の 1236C>T 多型 (韓国人との間) および 3435C>T (台湾人との間) があつた。*ABCB1* 多型の頻度比は、いずれも 1.5 以下であつたのに対し、*CYP2A6*\*4 多型は、2.3 倍と比較的大きな差であつた。従つて、本 *CYP2A6* 酵素で代謝される医薬品 (既存医薬品の例としては、アロマターゼ阻害薬レトゾール、ニコチン含有禁煙補助剤等) の有効性・安全性や喫煙による影響において、東アジア内の民族

差を考慮する必要性が示唆された。

また、東アジア 3 民族、日中韓における民族差は、ヨーロッパの地域差に比べ、*CYP2A6*\*4 を例外として、同程度または小さいことが示唆された。

(2) *in vitro* 評価系を用いた、フェニトイン共有結合性に関する遺伝子多型影響の検討

フェニトインによる重症薬疹では、*HLA-B\*51:01* の関与が報告されており、このハプロタイプでは東アジア内で頻度に民族差が認められている (日本人: 0.152、韓国人: 0.084、中国人: 0.054、台湾人: 0.044 と、日本人と台湾人間で設定基準値以上の頻度差有り)。しかし、本ハプロタイプのみで、重症薬疹発症の民族差は説明できないとされる。さらなる民族差要因の探索のため、ヒト P450 発現試料および CYP2C19 等の遺伝子型が決定されたヒト肝由来マイクロソーム試料を用いて、反応性代謝物のタンパク質アダクト生成を評価する *in vitro* 系により、HLA 以外の民族差要因としてのシトクロム P450 の遺伝子多型影響を解析した。

その結果、フェニトインでは、CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5 の発現マイクロソーム画分で NADPH 依存的にバンド (フェニトインアダクトタンパク質) が認められ、その生成にシトクロム P450 酵素の関与が示唆された。即ち、シトクロム P450 の活性がアダクト形成に重要と考えられた。CYP2C19 では、\*2 (681G>A, splicing defect、日本人における MAF=0.293) と \*3 (636G>A, Trp212stop、同 MAF=0.124) という頻度の高い機能欠損多型が知られている。この \*2 多型をホモ接合で有する場合、52-55 kDa 付近の 2 本のバンドが減弱 (約 52 kDa のバンドは消失) したことから、CYP2C19 の活性がフェニトインのタンパクアダクト生成に関与しており、CYP2C19 の機能欠損多型を有するヒトでは、アダクト生成が減弱し、有害事象が起こりにくいことが考えられた。*CYP2C19* の機能欠損多型 (\*2 と \*3) において、日中韓の間で頻度の民族差は認められない (\*2 と \*3 の合計 MAF=0.334~0.417) が、欧州白人の頻度 (MAF=0.124~0.161) とは大きな差が認められ、白人と東アジア人間の副作用発現における人種差の一要因となりうることが示唆された。

#### E. 結論

民族差要因として重要な機能変化を有する薬物動態関連の 6 遺伝子 12 多型について、東アジア諸民族と日本人との多型頻度差を文献調査した。中国人 (漢民族) と日本人間で、活性消失型である *CYP2A6*\*4 多型が、アレル頻度差として

0.114 (アレル頻度比で、2.32 倍) 認められたことから、注意すべきと考えられた。フェニトインのタンパク質アダクト形成に関与する CYP2C19 において、活性消失型多型はアダクト形成を低下させることが示唆され、副作用発現における人種差の一因となっている可能性が考えられた。

F. 健康危険情報：

該当無し

G. 研究発表：

論文発表

1. Kaniwa N, Saito Y.: The risk of cutaneous adverse reactions among patients with the *HLA-A\* 31:01* allele who are given carbamazepine, oxcarbazepine or eslicarbazepine: a perspective review. *Ther. Adv. Drug Saf.*, 4: 246-253, 2013.

学会発表

1. 斎藤嘉朗、杉山永見子、佐井君江、阿佐野霞、高松昭司：アジア人における薬物応答関連遺伝子の機能多型に関する民族差比較：日本薬物動態学会第 28 回年会 (2013.10、東京)
2. 斎藤嘉朗、杉山永見子、松澤由美子、阿佐野霞、高松昭司、佐井君江：遺伝子多型からみた東アジア圏の民族差：第 34 回日本臨床薬理学会学術総会 (2013.12、東京)
3. 佐井君江、松澤由美子、杉山永見子、花谷忠昭、斎藤嘉朗：東および東南アジア地域における薬物応答性遺伝子多型の民族差：日本薬学会第 134 年会 (2014.3、熊本)

G. 知的財産権の出願・登録状況：

該当無し

# CYP2A6\*4

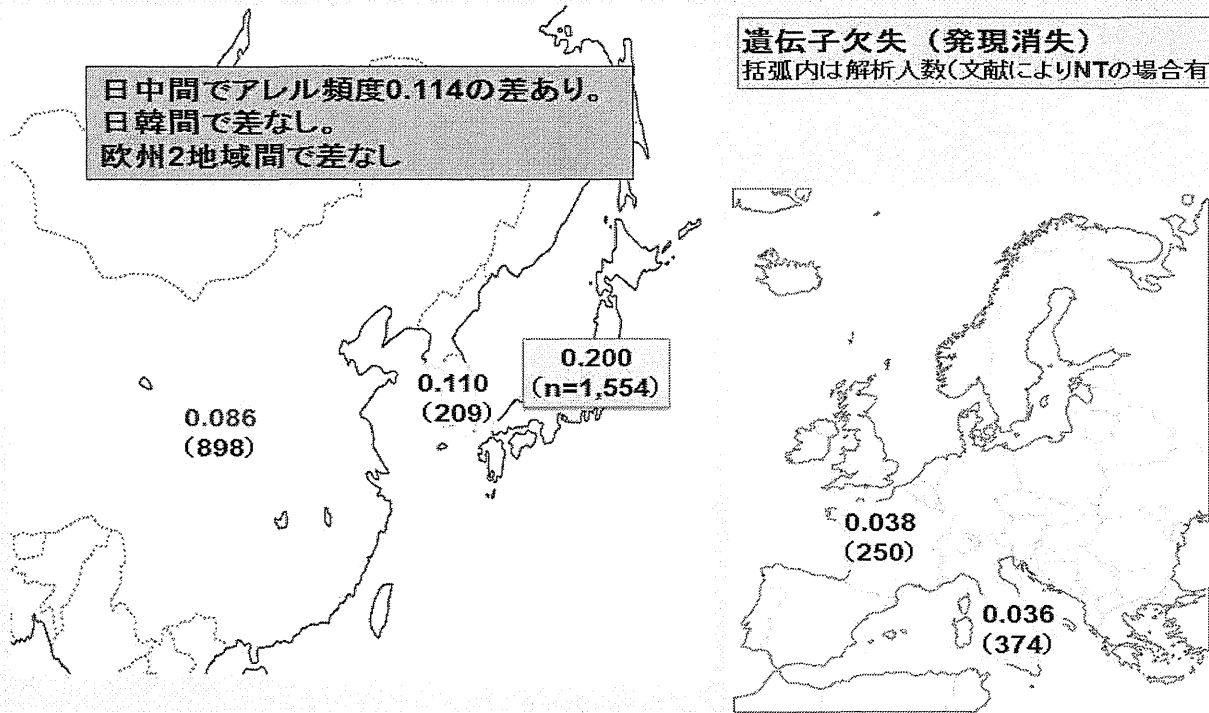


図1 東アジアおよびヨーロッパにおける CYP2A6\*4 のアレル頻度分布

# ABCB1 (P-gP)

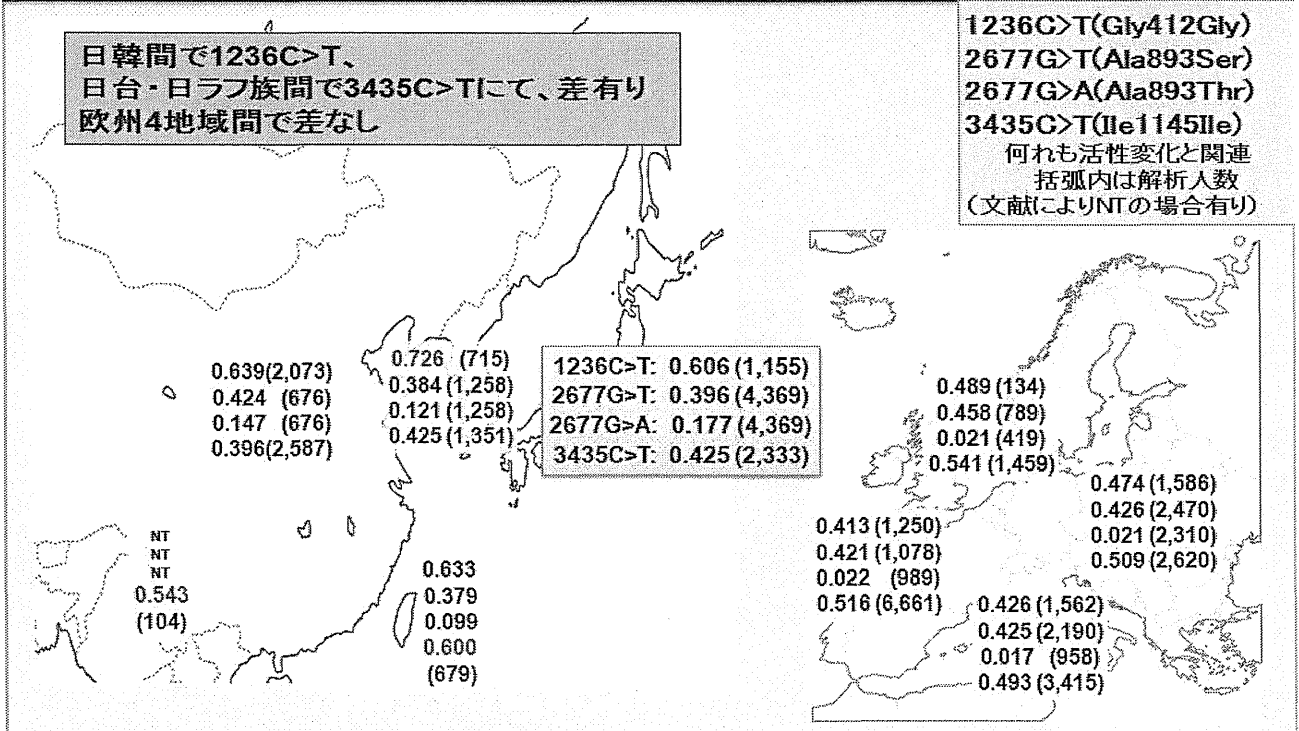
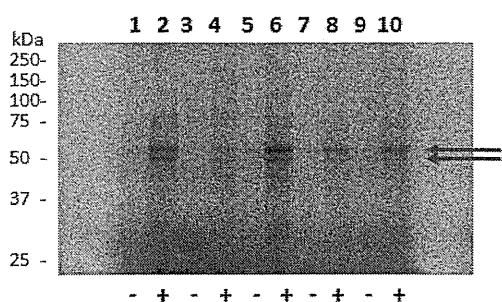


図2 東アジアおよびヨーロッパにおける ABCB1 多型のアレル頻度分布

## フェニトインアダクトタンパクの生成におけるCYP2C19多型の影響



| Lane | Microsome                          | 1※ |
|------|------------------------------------|----|
| 1    | HLM150 (pooled)                    | -  |
| 2    | HLM150 (pooled)                    | +  |
| 3    | HH651 (2C9 *2*3)                   | -  |
| 4    | HH651 (2C9 *2*3)                   | +  |
| 5    | HH519 (2C9 *3*3)                   | -  |
| 6    | HH519 (2C9 *3*3)                   | +  |
| 7    | HH40 (2C19 *2*2 PM <sup>2※</sup> ) | -  |
| 8    | HH40 (2C19 *2*2 PM)                | +  |
| 9    | HH689(2C19 *2*2 PM)                | -  |
| 10   | HH689(2C19 *2*2 PM)                | +  |

1※ + or - : NADPH regeneration system

2※ PM: poor metabolizer (2C19欠損)

| Microsome           | Gender/<br>Age/<br>Race | CYP2C9<br>Diclofenac<br>4'-hydroxylase<br>pmol/(mg x min) | CYP2C19<br>(S)-Mephenytoin<br>4'-hydroxylase<br>pmol/(mg x min) | CYP3A4<br>Testosterone<br>6β-hydroxylase<br>pmol/(mg x min) | CYP3A4<br>Western<br>blot<br>pmol/mg |
|---------------------|-------------------------|---|---|---|--------------------------------------|
| HLM150 (pooled)     |                         | 3100  | 57  | 4600  | 67                                   |
| HH651(2C9 *2*3)     | M/31/C                  | 550   | 9.4   | 720   | ND                                   |
| HH519(2C9 *3*3)     | M/70/C                  | 720   | 8.4   | 6400  | ND                                   |
| HH40 (2C19 *2*2 PM) | M/66/A                  | 1700  | 1.6   | 2400  | ND                                   |
| HH689(2C19 *2*2 PM) | F/46/C                  | 2800  | 5.4   | 2300  | ND                                   |

フェニトインアダクトタンパク質の生成には、CYP2C19とCYP3Aが寄与し、CYP2C19の活性消失型多型は、生成を減弱させることが示唆された。

3

図3 フェニトインアダクトタンパク質の生成に関するCYP2C19多型の影響

母集団薬物動態解析による東アジア民族間における民族的要因の探索

研究分担者 松本 宜明 日本大学 教授

研究要旨：

医薬品開発における薬物動態の変動要因解明として、遺伝的な内因的要因だけではなく環境などの外因的要因からの影響を検討することは有用である。これまで東アジア諸民族間での医薬品の有効性及び安全性に関する民族差について臨床研究が行われた。そこで本研究では、平成 21 年度～22 年度に実施された日中韓および白人を対象とした臨床薬物動態試験のデータを用いて、母集団薬物動態解析により民族的要因について明らかにすることを目的とした。さらに薬効への影響について検討した。シンバスタチンの解析では、オープンアシッド体の分布容積に対する年齢の影響が認められた。モキシフロキサシンの未変化体については、腎クリアランスに対する GFR と韓国人、分布容積に対する LBM と韓国人の影響が認められた。代謝物 2 種については BSA、*UGT1A1* 遺伝子多型並びに白人及び韓国人の影響が認められた。メロキシカムの解析では、クリアランスに対する *CYP2C9* 遺伝子多型、分布容積に対する LBM の影響が認められた。これらをメロキシカムの既存報告論文と比較し、さらに PK/PD 解析により薬効の予測を行った。*CYP2C9*\*3/\*3 の変異は大きく薬効に影響すると考えられる。

A. 研究目的：

新規の医薬品開発は、有効性及び安全性を確保し、最適な投与量、投与間隔を明らかにする必要がある。薬物は様々な薬理作用があるため、その応答性の研究が要求される。さらに薬物血液中濃度を用いて、体内での薬物動態を明らかにすると、薬物治療を確実に保証することができる。一方、医薬品開発期間を短縮するためには、東アジア地域において効率的な国際共同治験を行うことが考えられる。その場合、民族的な背景を明らかにすることは以後の開発の効率を左右する。東アジア諸民族での医薬品の薬物動態に関する民族差について遺伝的な内因的要因も含め科学的な検証を行うことは重要である。平成 21 年度～22 年度に、日中韓および白人を対象とした臨床薬物動態試験が実施され、民族間での薬物動態が明らかにされた。本研究では臨床薬物動態試験の結果から、日本人に対する民族的要因および遺伝的要因を、母集団薬物動態解析により薬物動態パラメータの変動要因として探索することを目的とした。シンバスタチン、モキシフロキサシン及びメロキシカムを用いて、同一の試験計画に基づいて、日本人、韓国人及び中国人の健康成人男子における臨床試験を実施した結果を用いた。対照として、米国在住の白人に対して同様な試験計画による試験を実施した結果を検討した。さらに昨年度の検討により明らかとなったメロキシカムの薬物

動態の変動要因である *CYP2C9* 遺伝子型および除脂肪体重が、メロキシカムの薬効に与える影響を定量的に評価するため、メロキシカムの薬物動態/薬力学モデルを構築し、メロキシカムの薬効のバイオマーカーであるトロンボキササン B<sub>2</sub> 生成率の変動をシミュレーションすることを目的とした。

B. 研究方法：

シンバスタチン：日本人、韓国人、中国人及び白人、各民族 40 名、合計 160 名の健康成人男性を対象とし、シンバスタチン 20 mg を非盲検下で単回投与した薬物動態学的臨床試験

(UMIN000003644) から得られた血漿中薬物濃度を用い、母集団薬物動態解析を行った。採血時間はシンバスタチン投与前、投与後 0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、8、12 及び 24 時間後とし、シンバスタチン及び 4 種類の代謝物を測定した。最初に親化合物であるシンバスタチンの解析を 2-コンパートメントモデルを用い薬物動態パラメータを求めた。その後、得られたシンバスタチンの薬物動態パラメータを固定し、代謝物の解析を 1-コンパートメントモデルを用いて実施した。

モキシフロキサシン：健康成人男性を対象としたモキシフロキサシンの薬物動態学的臨床試験

(UMIN000002968) によって得られたデータを対象とした。例数は日本人、韓国人、中国人及び白

人でそれぞれ 20、19、20 及び 20 例、計 79 例であった。モキシフロキサシン 400 mg を単回投与後の未変化体及び代謝物である M1 並びに M2 における血漿及び尿のデータ (図 1) を対象とし、血漿データはモキシフロキサシン投与前、投与後 0.5、1、1.5、2、3、4、6、12、24、36、及び 48 時間、尿データについては投与前、投与後 0-6、6-12、12-24 及び 24-48 時間に採取した。基本モデルとして、未変化体、M1 及び M2 に対して、尿中排泄を加味した経口 1-コンパートメント及び 2-コンパートメントモデルを検討した。解析の際には以下の仮定を考慮した：1. 投与された未変化体はすべて未変化体、M1 又は M2 のいずれかの形で吸収される。2. M1 及び M2 の吸収速度定数及びラグタイムは未変化体のものと同様である。3. 腸管循環の影響は無視することができる。4. 以前に報告されているマスバランス試験の結果から、代謝物 2 種における腎クリアランスと腎外クリアランスの割合を固定した。5. マスバランス試験で認められた糞中の未変化体はグルクロナイド体である M2 由来のものとした。また、得られた最終モデルに対し、ブートストラップ法を用いて薬物動態パラメータの頑健性を検討した。

メロキシカム：韓国人 21 名を対象とし、メロキシカム 15 mg 経口投与後の血中メロキシカム濃度推移およびトロンボキサン B<sub>2</sub> 生成阻害率の経時推移を報告した文献 (Bae *et al.* Br J Clin Pharmacol. 71(4)550-555, 2011) よりグラフデジタルライジングソフトウェア UN-SCAN-IT を用いて血中メロキシカム濃度-時間データおよびトロンボキサン B<sub>2</sub> 生成阻害率-時間データを抽出した。ベースラインのトロンボキサン B<sub>2</sub> 生成率を 100% とし、得られたトロンボキサン B<sub>2</sub> 生成阻害率との差からトロンボキサン B<sub>2</sub> 生成率を算出し、これを解析対象とした。得られた血中メロキシカム濃度-時間データおよびトロンボキサン B<sub>2</sub> 生成率-時間データを対象に、薬物動態モデルは並行吸収 1-コンパートメントモデル、薬力学モデルは、メロキシカムの作用機序から、トロンボキサン B<sub>2</sub> の生成を阻害する間接反応モデルを当てはめ、非線形混合効果モデルプログラム NONMEM によりパラメータを推定した。次に、これまでに構築した母集団薬物動態モデルを用い、除脂肪体重は 55 kg, CYP2C9 \*1/\*1 および CYP2C9 \*3/\*3 遺伝子型における血中メロキシカム濃度推移をシミュレーションし、先に構築した間接反応モデルを用い、トロンボキサン B<sub>2</sub> 生成率の経時推移をシミュレーションした。

(倫理面での配慮)

本研究で解析するデータの研究計画は大学病院医療情報ネットワーク (University Hospital Medical Information Network, UMIN) に登録されている。本研究の解析は、厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針」に則って行われ、母集団薬物動態解析については倫理審査委員会 (日本大学薬学部臨床研究に関する倫理審査委員会及び国立医薬品食品衛生研究所研究倫理審査委員会) で審査され承認を受けた。

### C. 研究結果および考察：

薬物の体内動態および薬効に影響する因子には、遺伝子、生体周期、生体の病態、コンプライアンス、環境と様々な因子を考察しなければならない。本研究では生体内生化学値、遺伝子等を要因として検討を行った。

シンバスタチン：シンバスタチン及び代謝物の 1 つであるオープンアシッド体の薬物動態パラメータが算出された。モデル評価の結果、シンバスタチンは 2 つのコンパートメント、オープンアシッド体を 1 つのコンパートメントとし、各コンパートメントから排泄し、シンバスタチンからオープンアシッド体のコンパートメントに連結するモデルが基本モデルとして構築され、薬物動態パラメータが算出された。共変量探索を効率化するため、シンバスタチンの薬物動態モデルを構築した後、オープンアシッド体を含めた薬物動態モデルを構築する逐次解析を行った。平成 24 年度の検討では、シンバスタチンは 1-コンパートメントモデルとしたが、今年度は 2-コンパートメントモデルとした。これらの薬物動態パラメータを検証するために、元のデータからブートストラップ法にて、160 名分のデータセットを 1000 個作成した。上述したモデルを当てはめ、復元抽出したすべてのデータセットにおいて、各々の薬物動態パラメータを求めた。その結果、シンバスタチン及びオープンアシッド体のそれぞれで高い収束率が確認され、最初に求めた薬物動態パラメータの頑健性が確認された。今年度の最終モデルによる共変量解析の結果、オープンアシッド体の分布容積に年齢の影響が確認されたが、シンバスタチン及びオープンアシッド体の薬物動態に人種による影響は認められなかった。

モキシフロキサシン：未変化体、M1 及び M2 の薬物動態をラグタイム有りの一次吸収を伴う尿中排泄 (図 1) を考慮したコンパートメントモデルで記述した。未変化体のみが 2-コンパートメントモデルに従い、代謝物 2 種については 1-コンパートメントモデルに従った。得られた最終



モデルでのバイオアベイラビリティを含む各化合物の薬物動態パラメータは以前に報告されていたものと一致していた。ブートストラップ法により薬物動態パラメータの頑健性を検討した結果、最終モデルにおける未変化体、M1 及び M2 のいずれのパラメータについても高い頑健性が示された。また、VPC による評価においても最終モデルは観察値をよく記述できていた。日本人との差を民族差として共変量解析を行った結果、モキシフロキサシンの未変化体については、腎クリアランスに対する GFR と韓国人、分布容積に対する LBM と韓国人の影響が認められ、代謝物 2 種については BSA、UGT1A1 遺伝子多型並びに白人及び韓国人の影響が認められたが、これらの影響による薬効への変動は小さいと思われる。

メロキシカム：文献より得られたメロキシカム投与後の血中メロキシカム濃度およびトロンボキササン B<sub>2</sub> 生成率の経時推移は、薬物動態モデルを並行吸収 1-コンパートメントモデル、薬力学モデルを間接反応モデルとした薬物動態/薬力学モデルにより、精度よく記述された。図 2 にメロキシカム 7.5 mg 単回投与におけるトロンボキササン B<sub>2</sub> 生成率のシミュレーションカーブを示す。CYP2C9\*3/\*3 変異型のトロンボキササン B<sub>2</sub> 生成率は大きく変動した。この結果は、代謝酵素の遺伝子変異が薬物動態に影響し、さらに薬効の変動につながることを強く示唆していると考えられる。

D. 健康危険情報：  
なし

E. 研究発表：

1. 鈴木大輔，青山隆彦，松本宜明「PK/PD 解析によるメロキシカムの薬効評価」（日本薬剤学会第 28 年会，平成 25 年 5 月 23-25 日，名古屋）
2. 影山明，青山隆彦，松本宜明「モキシフロキサシン薬物動態モデルによるトランジットモデルのパラメータ推定の検討」（第 30 回 TDM 学会・学術会，平成 25 年 5 月 25 日 26 日，熊本）
3. 荻野知美，青山隆彦，松本宜明「メロキシカム体内動態変動要因が薬効に与える影響の検討」（医療薬学フォーラム 2013 第 21 回クリニカルファーマシーシンポジウム，平成 25 年 7 月 20 日，金沢）
4. 小栗朋恵，原真由美，青山隆彦，青山幸生，林宏行，松本宜明「錠剤および細粒投与におけるアセトアミノフェンの母集団薬物動態解析」（医療薬学フォーラム 2013 第 21 回クリニカルファーマシーシンポジウム，平成 25 年 7 月 20 日，金沢）

5. 青山隆彦，荻野知美，上野高浩，福田昇，永瀬浩喜，松本宜明「ラットにおけるピロール-イミダゾールポリアミドの定量的構造-薬物動態相関解析」（日本薬学会第 134 年会，平成 26 年 3 月 27-30 日，熊本）

6. 大塔有希子，青山隆彦，鈴木豊史，深水啓朗，伴野和夫，松本宜明「飽和性・不飽和性コンポネントにより構成される膜透過速度式のパラメータ推定性の検討」（日本薬学会第 134 年会，平成 26 年 3 月 27-30 日，熊本）

F. 知的財産権の出願・登録状況：  
なし

G. 添付資料

(1) Effects on serum uric acid by difference of the renal protective effects with atorvastatin and rosuvastatin in chronic kidney disease patients. Kose E, An T, Kikkawa A, Matsumoto Y, Hayashi H. Biol Pharm Bull. 2014;37(2):226-31.

(2) A novel gene regulator, pyrrole-imidazole polyamide targeting ABCA1 gene increases cholesterol efflux from macrophages and plasma HDL concentration. Tsunemi A, Ueno T, Fukuda N, Watanabe T, Tahira K, Haketa A, Hatanaka Y, Tanaka S, Matsumoto T, Matsumoto Y, Nagase H, Soma M. J Mol Med (Berl). 2014 May;92(5):509-21. doi: 10.1007/s00109-013-1118-x. Epub 2014 Jan 25.

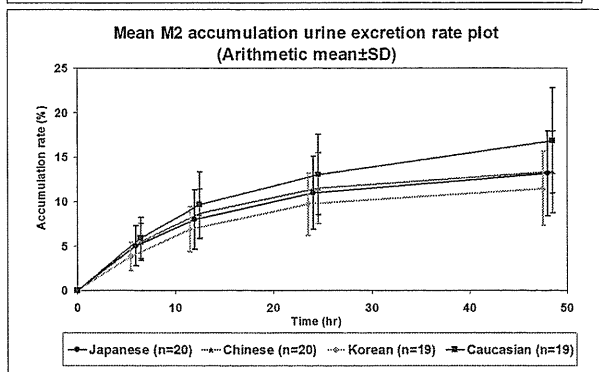
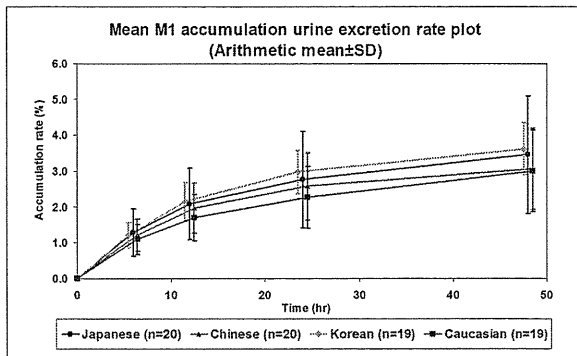
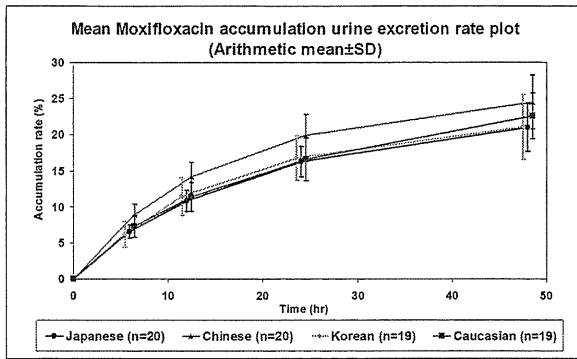


図1 モキシフロキシリン 400mg 投与後の未変化体、M1 及び M2 の累積尿中排泄率

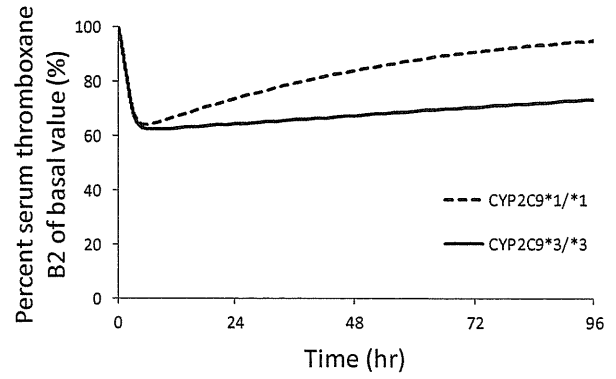


図2 メロキシカム薬物動態/薬力学モデルによりシミュレーションした *CYP2C9* 遺伝子型の薬効への影響  
投与量 7.5 mg、除脂肪体重 55 kg とした。

遺伝子発現を場にした薬物代謝の民族差に関する基盤研究

研究分担者 田中廣壽 東京大学 医科学研究所 教授

**研究要旨：**

我が国を含む東アジア諸民族を国際共同治験に組み込む治験システムの構築において、医薬品の応答性における民族的要因を補完することはきわめて重要と思われる。近年、核内レセプターの分子生物学的研究基盤を背景にその作用を選択的に制御する創薬が活発に展開されている。本研究は、核内レセプターの中でも臨床薬理学的に重要なグルココルチコイドレセプターGR と PXR に焦点をあて、それらの周辺分子の同定、エピジェネティック制御機構の解明、を通じて、これらのリガンドとなる薬剤の薬効と副作用の民族差、人種差を解明する分子基盤を確立することを目的とする。

PXR はある種の薬物依存性に CYP3A4 などの薬物代謝酵素の発現を遺伝子レベルで制御する。これまで PXR 自体の民族的差は軽微とされていた。わたしどもは、質量分析法などによって新たな PXR 結合タンパク候補を複数単離した。まず、CBP/p300 は転写共役因子として知られ、PXR の転写調節機構にもすでに関与することが報告されていた。今回、それに加え、PXR と相互作用する因子として p60 を単離した。P60 は PXR 応答性レポーター遺伝子発現を負に制御した。かかるタンパク-タンパク相互作用は乳がん細胞株において顕著に認められ、乳がんの病因病態とこれらの分子の関係が示唆された。今後、GR、PXR による遺伝子発現制御のエピジェネティック制御機構をさらに明確にすることによって、これらのレセプターを標的とする医薬の薬効・副作用の民族差・人種差に関わる分子基盤を解明しようとする。

**A. 研究目的：**

医薬品の応答性における民族的要因を補完することによって、我が国を含む東アジア諸民族を国際共同治験に組み込む治験システムの構築が可能になり、日本および東アジア諸国を含めた国際共同治験が効率的に実施できるものと考えられる。そこで、薬効を規定する薬効受容体の遺伝子変異と薬効の発現について基礎的に検討し、薬効に民族差を生じる原因の一部を解明する方法を確立することは急務と言える。

核内レセプターはリガンド依存性転写因子として多彩な生理的役割を果たしている。従来、グルココルチコイドに対する応答性の人種差、民族差のメカニズムはGRの遺伝子多型、SNIPsに関する研究から解析されてきたが、いまだにその分子基盤は脆弱であり、臨床薬理学的応用可能な成果に乏しい。近年、GRを含む核内レセプターによる遺伝子発現制御は組織あるいは遺伝子選択的なエピジェネティック制御を受ける実態が明らかとなり、GRと標的DNAを含むその周辺分子の解析からグルココルチコイド応答性の理解が進展している。しかし、かかる研究をグルココルチコイド応答性の民族差や人種差に結びつけた研究はない。一方、pregnane X receptor (PXR) は胆汁酸などの内因性生理活性物質や薬剤をリガンドとし、それらの吸収・分配・代謝・排泄を

担う臓器である肝臓と小腸に高発現している特異な核内レセプターである。その代表的標的遺伝子には、CYP3A4、CYP7 $\alpha$ などがある。これまで、PXRの遺伝子多型、SNIPsと薬物の有効性、副作用の民族差、人種差に関して臨床薬理学的重要性から多くの研究がなされてきた。しかし、PXRのエピジェネティック制御機構には不明な点が多く、その周辺分子の解析も立ち後れている。そこで、われわれは、核内レセプターの中でも臨床薬理学的に重要なこれらの二つの分子に焦点をあて、転写共役因子を含むそれらの周辺分子の同定、エピジェネティック制御機構の解明、を通じて、これらのリガンドとなる薬剤の薬効と副作用の民族差、人種差を解明する分子基盤を確立することを目的とする。

**B. 研究方法：**

1) GR、PXR 機能をエピジェネティックに制御する分子の同定とその機能解析

すでに構築した Flag タグ付き GR、PXR 発現系を bait として GR、PXR 結合タンパク質を質量分析法によって網羅的に同定する。各々に関して、発現プラスミドを作成し、GR、PXR 応答性遺伝子発現に与える影響をトランスフェクション法を用いたレポーターアッセイで検討する。

2) 同定した周辺分子の個体における機能解析  
各々の核内レセプターに関して、同定したエピ  
ジェネティック制御分子のアデノウイルス発現  
系構築、遺伝子改変動物作成などによって個体  
における役割の解析を行う。

(倫理面での配慮)

組み替え DNA 実験、動物実験などは法令、施設  
基準などを遵守して実施した。

#### C. 研究結果：

すでに、Flag-GR、GST-HEXIM1 を用いた解  
析などから、核内タンパク HEXIM1 が GR にリ  
ガンド非依存性に結合することを見いだしてい  
た。昨年度、心筋特異的 HEXIM1 トランスジェ  
ニックマウスを作成したが、GR との相互作用を  
個体レベルで明確にするため、心筋特異的 GR 遺  
伝子破壊マウスもあわせて作成した。現在、  
GRKO、HEXIM1KO を交配させ、ダブルノック  
アウトマウスを作成中である。今後、グルココル  
チコイド応答の個体差に関する HEXIM1 の意義  
をかかると動物モデルを用いてさらに究明する。

同様に、質量分析法によって PXR 結合タンパ  
ク候補を単離した (図 1)。中でも、既知のタンパ  
ク質である CBP/p300 は PXR に直接結合し  
CYP3A4 などの標的遺伝子発現を正に制御する  
ことがわかった。今回、分子量 60kDa のタンパ  
ク p60 に関して分子生物学的に解析した (図 2-4  
)。その結果、p60 は PXR 応答性レポーター遺  
伝子発現を負に制御した。かかるタンパク-タンパ  
ク相互作用は乳がん細胞株において顕著に認め  
ら、乳がんの病因病態とこれらの分子の関係が示  
唆された。

#### D. 健康危険情報：

とくになし。

#### E. 研究発表：

1. Osamu Hosono, Noritada Yoshikawa, Noriaki Shimizu, Shigeru Kiryu, Masaaki Uehara, Hiroshi Kobayashi, Ryo Matsumiya, Akiko Kuribara, Takako Maruyama, \*Hiroto Tanaka. Quantitative analysis of skeletal muscle mass in patients with rheumatic diseases under glucocorticoid therapy - comparison among bioelectrical impedance

analysis, computed tomography, and magnetic resonance imaging. Modern Rheumatology, in press

2. 松宮遼、清水宣明、吉川賢忠、丸山崇子、田中廣壽 [リウマチ性疾患にみられる筋病変と合併症]ステロイドミオパチーの診断と治療 リウマチ科 (0915-227X) 49 巻 4 号 463-470、2013 年 4 月
3. 田中廣壽、細野治、小林弘、吉川賢忠、松宮遼 [関節リウマチ - ケアからキュアを目指した治療]薬物治療とその留意点 ステロイド 日本臨床 (0047-1852) 71 巻 7 号 1261-1265、2013 年 7 月
4. 吉川賢忠、田中廣壽  
RA におけるステロイドの功罪と新規ステロイド剤の開発への期待 リウマチ科 (0915-227X) 51 巻 2 号 218-228、2014 年 2 月

#### F. 知的財産権の出願・登録状況：

なし。

#### G. 添付資料

なし。

図1 PXR 結合タンパクの同定法 (概念図)

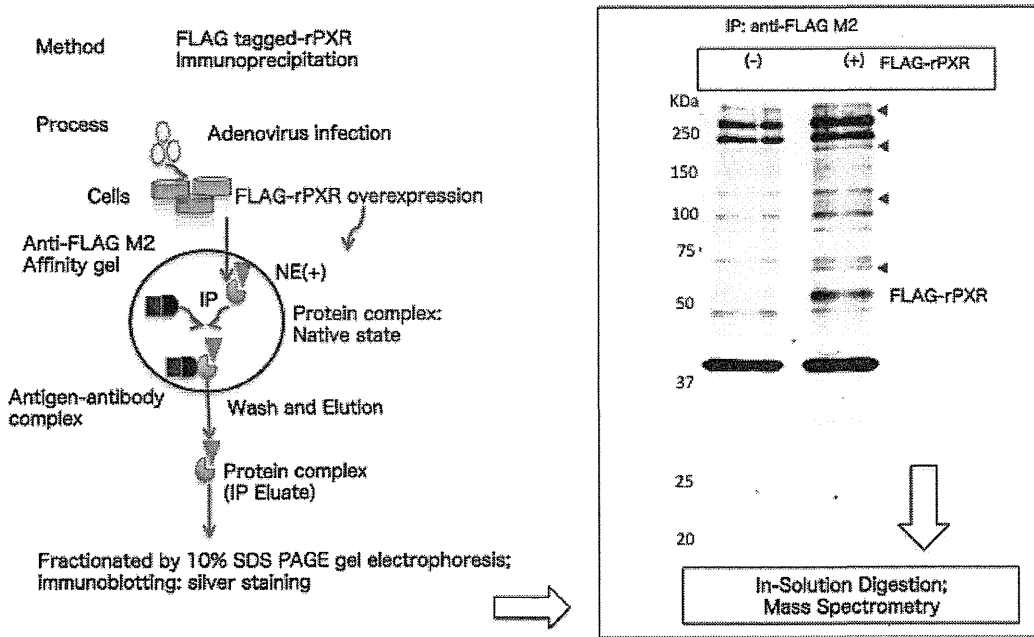


図2 PXR と p60 の相互作用 - 免疫沈降法による検討 1

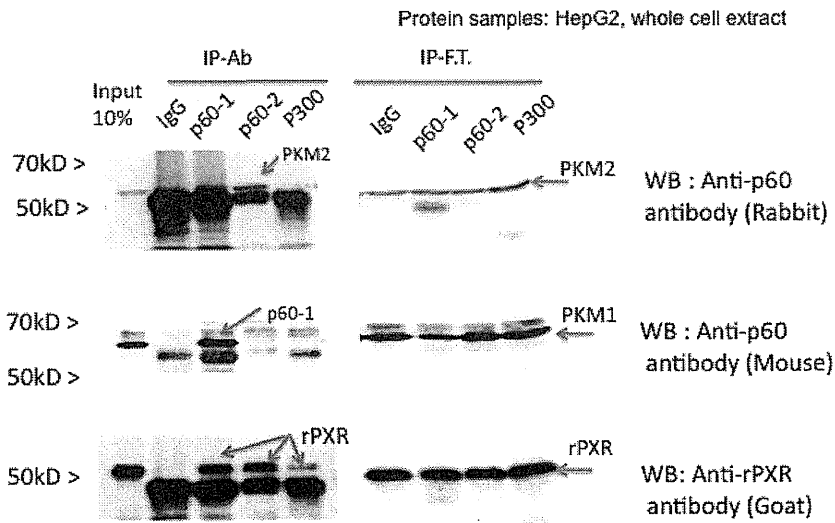


図3 PXR と p60 の相互作用 - 免疫沈降法による検討 2

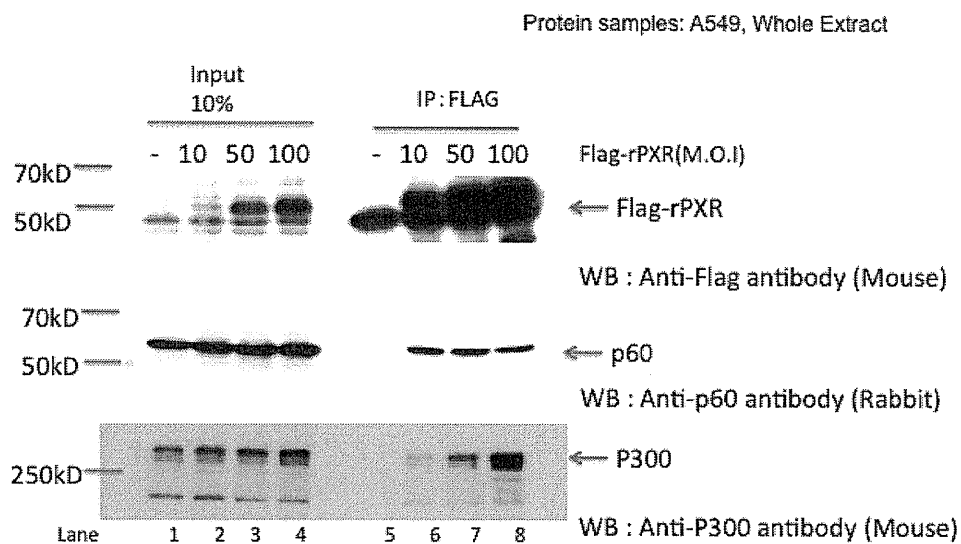
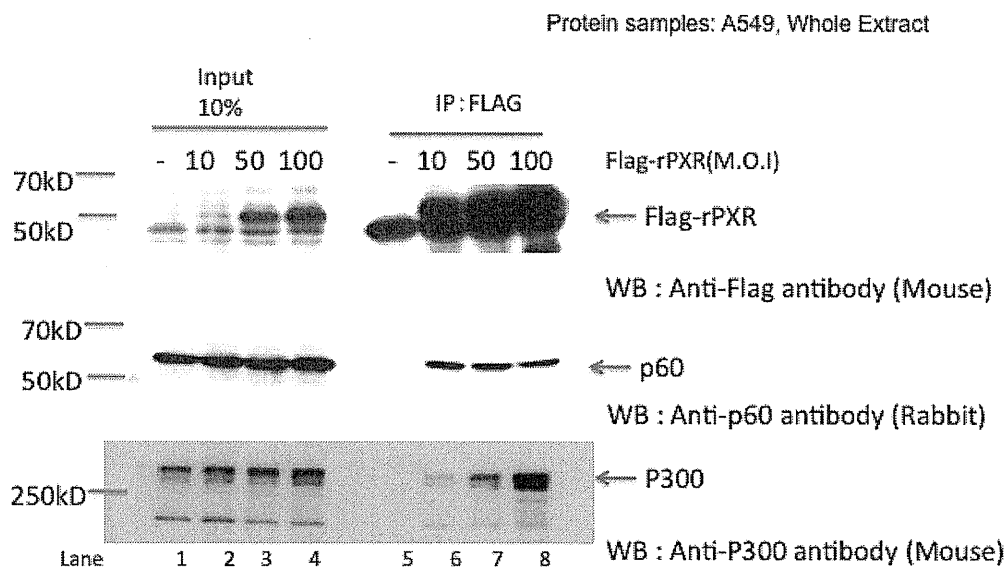


図4 PXR と p60 の相互作用 - ドメイン解析



## IV. 研究業績

## The Role of the Japanese Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics in the Transition of Clinical Studies in Japan

JMAJ 56(2): 115–117, 2013

Masako NAKANO,\*<sup>1</sup> Hajime IJIMA,\*<sup>1</sup> Kanji TAKADA,\*<sup>1</sup> Naoki UCHIDA,\*<sup>1</sup>  
Shinichi KAWAI,\*<sup>1</sup> Toshifumi KAGIYA,\*<sup>1</sup> Yuji KUMAGAI\*<sup>1</sup>

The Japanese Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics (JSCPT) was founded in 1969 as an academic society of clinical pharmacologists aiming to contribute to the establishment of scientific and rational drug therapy. In 1979, this group officially became the JSCPT, and has become an important entity in the field of clinical studies, taking a leading role in the implementation of the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Good Clinical Practice (GCP) in Japan. The JSCPT currently has a membership of approximately 3,200 members, consisting of medical doctors, pharmacists, researchers, regulators, and clinical research coordinators (CRCs). Promoting clinical studies is one of the most important missions of the JSCPT, which aims to resolve problems such as the delay in the development of new drugs in Japan, so-called the “Drug Lag.”

Japan has been one of the few countries where the whole process of drug development, from discovery and non-clinical studies to early and late phase clinical studies and also post marketing surveillances and studies, can be carried out entirely in one country, but the regulatory acceptance of only studies conducted in Japan led to isolation from international drug development. In order to begin clinical trials, Japanese regulatory agencies required more non-clinical data compared to other countries, and flexible protocols were not accepted. Regulators were conservative with regard to safety, and exceptions were rarely made. For later phase trials with

a large number of subjects, the pace was slow and the cost high. Investigators were not familiar with the GCP concept and lacked resources for conducting clinical trials. Unlike clinical studies initiated by investigators, clinical trials for registration were not considered to be scientific work, and there were no incentives for investigators to conduct them. As a result, each site was able to recruit less than ten subjects, leading to a high number of sites for one protocol, which resulted in inefficient clinical trials. Another factor that delayed the start of clinical trials in Japan was that the final formulation was expected to be provided at the start of the trial.

With the implementation of the ICH agreement, many aspects of drug development were harmonized with Western countries. Since the agreement with ICH, there is no longer a significant difference in the amount of non-clinical data required at each stage of clinical development. Regulatory agencies started to accept the use of foreign data, which enabled the “Bridging Strategy” (bridge with Phase 2 data and extrapolate non-Japanese Phase 3 data) and allowed Japan to join global trials and to use the data from these trials for registration. This led to an increase in global trials including Japan, but the number of clinical trials conducted in Japan and the total number of Japanese patients exposed to the drug candidate at the time of New Drug Application (NDA) declined. At the same time, Asian countries became more efficient in enrolling patients in late phase clinical trials, and Japan was not able to keep up with the speed.

\*1 Public Relations Committee, the Japanese Society of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Tokyo, Japan (clinphar@jade.dti.ne.jp).



To improve the situation, the Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) initiated a 5-year Activation Plan for Clinical Trials focusing on multinational confirmatory trials, and the plan was successful to some extent. The number of multinational trials in Japan increased and speed and quality improved, but the realization was that Japan is not highly competitive in large-scale clinical trials. At the end of the 5-year Activation Plan, Japanese regulatory agencies shifted their focus to early clinical studies, where Japan can contribute to global drug development by utilizing the infrastructure of and abundant experience accumulated through early clinical studies such as first-in-human (FIH) studies and dose finding studies. Under this concept, the MHLW accredited 5 core hospitals for exploratory clinical studies to promote FIH studies of original Japanese candidate compounds. Clinical pharmacology units (CPUs: clinical facilities that specialize in clinical pharmacology studies such as FIH studies) have been established in several university hospitals, and private CPUs have enhanced their facilities for FIH studies. Several university hospitals have opened PET centers, enabling them to conduct certain types of POC studies. There are sites that have specialized equipment and technologies that enable special studies, such as glucose clamp studies for glucose lowering drugs and polysomnography (PSG) studies for sleep drugs. The Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) now has more drug development professionals, and they are able to make appropriate judgments regarding the balance between risks and benefits. Flexible protocols have gradually been accepted and are supported by the FIH study guidelines that were issued on April 2, 2012. Primitive formulations (such as liquid formulations which are replaced by solid formulations later in the clinical development process) are now accepted for clinical pharmacology studies in Japan.

Early phase clinical studies are actually a very important and interesting part of clinical development. In the FIH single ascending dose (SAD) study, the drug candidate is tested for the first time in humans and a very wide dosage range is studied, usually at least in the range of 100 times. This study produces data to determine dosage levels and the frequency of dosing for the next study, which is typically the multiple ascending dose (MAD) study. The MAD study produces

the first time-dependent data in humans for the drug candidate. With the increase in available biomarkers, we can often explore the Proof-of-Concept (POC) and sometimes the pharmacodynamic (PD) effects of the drug candidate in these Phase 1 studies as well. The POC study is designed to answer the question of whether or not the drug mechanism is working. Even with the advanced non-clinical methods that are now available, it is not possible to predict all aspects of drugs candidates when they are administered to humans, and consequently the learning curve is very steep at this early phase of clinical development. With the data from these early phase clinical studies, a huge amount of new and important information is gained. The data may confirm findings in non-clinical studies, but often surprises us as well. Sometimes the drug development strategy may need to change significantly, and sometimes the indications can completely change, as seen in the example of sildenafil, which was originally developed for hypertension and ischemic heart diseases, but the indications changed to erectile dysfunction (ED) based on findings in early clinical studies. These data often lead to decisions regarding whether or not drug development should be continued for the drug candidate and provides information on how to design the late phase studies if the decision is to proceed to late phase clinical development.

At the same time, early phase clinical studies are complicated and pose higher risks than late phase clinical studies. Therefore, it is important that experienced investigators and staff conduct these studies in facilities that are designed for such studies. For example, it is critical that there is access to emergency care for Phase 1 studies. It is also important that the study site is designed to handle the busy study schedule (frequent procedures) and the condition of the subjects is visible during the critical hours. Usually, about 8 subjects are dosed on the same day at a site, and accurate procedures produce data with less variability. CPUs in Japan have abundant experience, and many efficient processes are in place. For example, the unit usually has synchronized clocks, and many sites color code sample tubes so that there is less likelihood of mixing them up. With this experience, established systems, and attention to detail, the data that is generated by these Japanese CPUs are of high quality, and because of the low variability there is a better

chance that drug signals will be observed, even with a small number of subjects. Recruiting patients for Phase 1 studies has been challenging in any country because CPUs used to focus on healthy subjects. However, recent data shows that CPUs in Japan can recruit patients with good speed.

As discussed above, the infrastructure, experience, and current regulatory environment have made Japan an ideal place for conducting early

phase clinical studies. The JSCPT is a medical society of investigators, researchers, and site staff who conduct early phase clinical studies. By promoting clinical studies, the JSCPT has aimed to resolve the “Drug Lag” in Japan. This is another opportunity for the JSCPT to play a key role in providing high quality early clinical data not only for drug development in Japan, but also for the global development of pharmaceuticals.

# Leptin stimulates interleukin-6 production *via* janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 in rheumatoid synovial fibroblasts

S. Muraoka<sup>1</sup>, N. Kusunoki<sup>1</sup>, H. Takahashi<sup>2</sup>, K. Tsuchiya<sup>2</sup>, S. Kawai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine; <sup>2</sup>Department of Orthopaedic Surgery Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan.

---

## Abstract

### Objectives

*The aim of this study was to determine the influence of leptin on the production of proinflammatory cytokines by rheumatoid synovial fibroblasts (RSFs).*

---

### Methods

*Synovial tissue was obtained from patients with rheumatoid arthritis (RA). Leptin receptor mRNAs were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Productions of mRNA and protein of interleukin (IL)-1 $\beta$ , tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and IL-6 in the culture medium were detected by real-time PCR and ELISA kit, respectively. Small interfering RNA (siRNA) was transfected into RSF to down-regulate the expression of leptin receptor. Effects of inhibitors of janus kinase 2 (JAK2), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), and mitogen-activated protein kinase (MAPK) on IL-6 production were evaluated. Phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in RSF were determined by Western blot analysis.*

---

### Results

*We detected leptin receptor mRNAs in RSFs. Expression of IL-1 $\beta$  and IL-6 mRNA was enhanced in a concentration-dependent manner by addition of leptin to RSFs. IL-6 secretion by RSFs showed an increase after leptin stimulation. Leptin-induced production of IL-6 by RSFs was decreased after exposure to siRNA targeting leptin receptor (Ob-Rb). A JAK2 inhibitor, but not PI3K and MAPK inhibitors, decreased leptin-induced IL-6 production. Enhanced phosphorylation of STAT3 was observed in RSFs after stimulation by leptin.*

---

### Conclusion

*Leptin may be one of the proinflammatory cytokines that up-regulates IL-6 production in RSFs via activation of JAK2/STAT3. Leptin and JAK/STAT pathway may represent a new alternative therapeutic target in the treatment of RA.*

---

### Key words

leptin, rheumatoid arthritis, IL-6, JAK2, STAT3

Sei Muraoka, MD

Natsuko Kusunoki, PhD  
Hiroshi Takahashi, MD, PhD  
Kazuaki Tsuchiya, MD, PhD  
Shinichi Kawai, MD, PhD

Please address correspondence  
and reprint requests to:

Natsuko Kusunoki, PhD,  
Division of Rheumatology,  
Department of Internal Medicine,  
Toho University School of Medicine,  
6-11-1 Omori-Nishi, Ota-ku,  
Tokyo 143-8541, Japan.

E-mail: kusunoki@med.toho-u.ac.jp

Received on November 22, 2012; accepted  
in revised form on February 5, 2013.

© Copyright CLINICAL AND  
EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY 2013.

## Introduction

Adipose tissue is a structural component of many organs and a site for energy storage. In addition, recent studies have demonstrated that the major cellular component of adipose tissue, the adipocyte, has the ability to synthesise and release physiologically active molecules such as leptin, adiponectin, and resistin, as well as cytokines like interleukin (IL)-6 and tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (1). These molecules are called adipokines or adipocytokines. Some adipokines may have a central role in the regulation of insulin resistance (2), as well as being involved in many aspects of inflammation and immunity (3). Leptin is the product of the *ob* gene, and is a 16-kDa non-glycosylated peptide hormone synthesised almost exclusively by adipocytes that regulates appetite and energy expenditure centrally at the hypothalamic level (4). It is also suggested that leptin may contribute to inflammation and auto-immunity (5). This is not explained by gene background such as polymorphism of LEP rs2167270 (19 G>A) (6).

Rheumatoid arthritis (RA) is characterised by extensive inflammation and proliferation of the synovium that affects multiple joints. Since proinflammatory cytokines, including TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6, play a central role in the pathophysiologic mechanisms of RA, novel methods of neutralising these cytokines with monoclonal antibodies or soluble receptors have recently been developed as new treatments for this disease (7). Although blockade of the above-mentioned cytokines is beneficial, it is not curative and the effect is only partial, with many patients failing to respond. Therefore, it seems possible that other proinflammatory cytokines may also contribute to inflammation in RA. We previously reported that adiponectin (one of the adipokines) stimulates the production of IL-8 (8) and prostaglandin E<sub>2</sub> (9) by rheumatoid synovial fibroblasts (RSFs). We also reported that the serum levels of leptin and adiponectin were elevated in patients with RA (10). Moreover, leptin levels are increased in synovial fluid of RA patients (11).

These findings suggest that some adipokines may contribute to synovial inflammation in RA. Accordingly, we examined the direct effects of leptin on cultured RSFs in the present study.

## Materials and methods

### Materials

Recombinant human leptin was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and was dissolved in 15 mM HCl and 7.5 mM NaOH at a pH of approximately 5.2, in accordance with the manufacturer's instructions. Recombinant IL-6 was purchased from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA) and was dissolved in sterile phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% (volume/volume) bovine serum albumin to prepare stock solutions. Mouse anti-human IL-6 antibody was obtained from R&D Systems, Inc. Rabbit anti-human signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 polyclonal antibody and rabbit anti-human phosphorylated STAT (phospho-STAT) 3 (Tyr705) polyclonal antibody were sourced from Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG was obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA, USA). ECL Western blotting detection reagent was purchased from GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, UK), and polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P) were obtained from Millipore Corp. (Billerica, MA, USA). AG490 (2-cyano-3-[3,4-dihydroxyphenyl]-N-[phenylmethyl]-2-propenamide), a janus kinase (JAK)2 inhibitor came from Merck KGaA (Darmstadt, Germany), while LY294002 (2-[4-morpholinyl]-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one), a phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor and PD98059 (2-[2-amino-3-methoxyphenyl]-4H-1-benzopyran-4-one), a mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor for extracellular signal-regulated kinase (ERK) were from Sigma-Aldrich. RPMI 1640 medium, penicillin/streptomycin solution, fetal bovine serum (FBS), and 0.25% trypsin/EDTA were sourced from Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA, USA). PBS was purchased from Takara Shuzo

*Funding:* This work was supported in part by Heisei 20 and 23 Strategic Research Foundation Grants from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science & Technology to Toho University; grants from the Japan Society for the Promotion of Science to S.K. (23591449) and N.K. (24791008); and grants from the Nakatomi Foundation and Takeda Science Foundation to N.K.

*Competing interests:* none declared.