

DDS による薬物動態制御と薬物動態解析法の構築に関する研究

創薬物理化学講座 金澤秀子, 伊藤佳子, 西尾忠

1. はじめに

国民の健康不安の要因となる重大疾病克服のためには革新的医薬品の開発が急務である。医薬品開発の効率化と副作用の軽減のためには、薬物動態 (ADME) は重要なファクターであり、製薬企業においては新薬開発における候補化合物の探索段階から薬物動態評価に力が注がれている。特に製剤の物理化学的性質の解析は吸収や分布を予測するパラメータとして重要であり、迅速かつ微量な分析手法が必要とされている。

我々は、これまで温度応答性高分子 poly-N-isopropylacrylamide (PNIPAAm) を用いた分離担体により様々な医薬品の分離を純水のみで分離する新しい分離システム温度応答性クロマトグラフィーを開発している。さらに本システムにより製薬企業で医薬品開発の際に用いられる薬物代謝酵素シトクロム P450 の主なプローブ薬物とその代謝物の同時分析にも成功している。個々の患者の薬物代謝能評価に大きな役割を担っている被験薬物とその代謝物の高効率かつ簡便な分離が可能となり、ゲノム情報に基づく患者個人の代謝能解析への応用が期待される。本研究では、これらに基づいた効率的な薬物動態解析システムの構築を目指している。

さらに選択的な薬理効果の向上ためには、ドラッグデリバリー技術による高度な制御システムと適切な薬物放出制御機構を備えた薬物キャリアの開発が必要となる。製剤開発に必要な安定性・標的指向性・生体適合性の向上と生体内動態の精密制御を目的としたドラッグデリバリーシステム (DDS) を設計する。DDS による薬物動態制御と的確な動態解析技術により安全な薬物投与設計に必要な情報を与えることが可能となることから、本プロジェクトの目的である効率的な医薬品開発と副作用軽減につながるものと期待される。

2. 温度応答性クロマトグラフィーによる薬物動態解析システムの開発

温度応答性高分子 PNIPAAm とその共重合体を用いた新しい分離システムにより水のみの移動相で麻酔薬プロポフォールの高感度な薬物動態解析が可能となった。プロポフォールは、脂溶性が高い超短時間作用型静脈麻酔薬である。現在最も繁用されている静脈麻酔薬のひとつであるが、個々の患者の状態や外科的刺激の強さに応じた用量設定のためには術中でのリアルタイムモニタリングが望まれる。従来法では移動相に有機溶媒を使用するため手術中での使用には患者への有機溶媒暴露が大きな問題となり使用できない。温度応答性クロマトグラフィーを用いることにより、サル動態解析に適用したところプロポフォールの血中濃度測定が水のみの移動相で蛍光検出により高感度で行えることが確認された。血中濃度推移は従来法の ODS カラムによる結果及び TCI シミュレーションの結果と一致し

ていた。また独自に前処理カラムを作成し、血清試料の前処理に応用可能であることを確認している。本システムの血中濃度測定への有用性が確認されたことから、医療現場においても安全で簡便な純水のための移動相を用いたリアルタイムな血中濃度測定が期待できる。

3. 機能性高分子を用いたドラッグデリバリーシステムの構築

PNIPAAm は水中での温度刺激に応答し、32℃より低温側では水に溶解し水和伸展状態、高温側では水に不溶となり脱水と収縮状態と構造変化を起こす温度応答性が知られている。この親水/疎水性の相変化は可逆的かつ迅速であり、相変化を起こす温度(LCST)は、高分子の分子設計により自由に制御することができる。PNIPAAmはLCST以下で親水性を示すため、リポソームなどのナノ粒子に導入することで外側に水和層を形成し、肝臓や脾臓などの細網内皮系組織による取り込みを回避して血中滞留性を向上させることが期待できる。さらにPNIPAAmを導入すると封入率の向上やリン脂質同士の凝集が回避できることが確認された。ナノ粒子は、腫瘍集積性の向上を目的として100 nm程度のサイズに調製した。ヒト大腸がん由来 Caco-2 細胞を用いて抗がん剤イリノテカンのリポソームからの放出とその効果について、LCSTが41℃となるよう設計したP(NIPAAm-co-DMAPAAm)を用いて培養温度を37℃と42℃とで比較したところ、37℃に比べ42℃では強い殺細胞作用が確認された。37℃では高分子鎖に変化が起こらずナノ粒子は比較的安定であるが、42℃では高分子鎖が収縮し膜を不安定化するため、内封した薬物が放出されると考えられる。これにより温度応答性ナノ粒子はLCSTに応じた温度応答性の薬物放出制御が可能であることが確認された。抗がん剤使用時に温熱療法と併用することにより、副作用の少ない抗がん剤適正使用が期待できる。

4. まとめ

本研究では、温度応答性高分子を用いた新しい分離システムにより水のための移動相で麻酔薬プロポフォールの高感度な薬物動態解析が可能となった(Nishio et. al. *J. Chromatogr. A*, 2009)。また、機能性ナノ粒子を用いたDDSにより抗がん剤の温度による放出制御が可能であることを明らかにした。機能性粒子DDSによる効果的な製剤技術と新しい動態測定法により本プロジェクトの目的である効率的な医薬品開発と副作用軽減につながるものと期待される。

CYP3A4 変異型分子種の代謝活性に対する阻害剤の阻害強度の比較

臨床薬学講座 大谷 壽一

【背景・目的】

臨床的に最も重要な薬物代謝酵素の一つである cytochrome P450 (CYP) 3A4 には、これまでに 20 のアミノ酸変異を伴う遺伝子多型が同定されている。そして、野生型 (CYP3A4.1) と、比較的高頻度に見られる変異型である CYP3A4.2、.7、.16、.18 の間では、酵素キネティクスに違いが認められている。CYP3A4 は多くの薬物の代謝を担っていることから、臨床で問題となる薬物相互作用も CYP3A4 の阻害に起因したものが最も多い。そのため野生型と変異型の間で、代表的な CYP3A4 阻害剤に対する感受性に差異があるか否かを定量的に評価することは臨床的に重要と考えられる。そこで本研究では、大腸菌を用いて発現させた CYP3A4.1、.2、.7、.16、.18 を用い、それらのテストステロン 6 β 水酸化活性に対する、代表的な CYP3A4 競合阻害剤、イトラコナゾール [ITCZ] および シメチジン [CMD] の阻害特性を比較検討するとともに、得られた結果を、CYP3A4 変異型分子種と基質および阻害剤のドッキングシミュレーションの結果と比較検討した。

また、CYP3A4 の阻害を介した薬物相互作用の中でも、mechanism-based inhibition (MBI) と呼ばれる不可逆的な酵素阻害が原因となる場合は、阻害剤が体内から消失しても代謝活性が持続的に阻害されるため、特に临床上問題となりやすい。そこで上記検討に加え、CYP3A4 野生型と変異型の間で、CYP3A4 に対する代表的な MBI 阻害剤 (エリスロマイシン [EM]、クラリスロマイシン [CAM]) の阻害キネティクスの差異を検討した。

【方法】

1) CYP3A4 各分子種の代謝活性に対する競合阻害剤の代謝阻害実験

基質テストステロン (TST) と、阻害剤 ITCZ または CMD を含む K⁺ phosphate bufer に CYP3A4.1 (wild type)、.2、.7、.16、.18 を発現させた大腸菌膜画分を添加し、37°C で 10 分間のプレインキュベーション後、NADPH およびその再生系を添加し反応を開始した。反応液を 20 分間の代謝反応を行い TST の代謝物を HPLC-UV 法により定量した。

2) CYP3A4 各変異型分子の競合阻害パラメーターの算出

得られた各濃度における代謝速度 (v) に Eq.1 を、非線形最小二乗法を用いてあてはめ、ミカエリス定数の対数値 (ln K_m)、最大代謝速度 (V_{max})、及び阻害剤の阻害定数の対数値 (ln K_i) を算出した。

$$v = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Eq. 1}$$

[S]: 基質濃度, [I]: 阻害剤濃度

3) CYP3A4 各分子種の代謝活性に対する MBI 阻害剤の代謝阻害実験

K⁺ phosphate bufer 中に、CYP3A4 発現大腸菌膜画分と阻害剤 (EM または CAM) を添加し、37°C で 10 分間安定化させた後、NADPH 及びその再生系を添加し、0~45 分間のプレインキュベーションを行った。続いて、NADPH、その再生系、EDTA、および基質 (TST) を添加し、20 分間の代謝反応を行い TST の代謝物を HPLC-UV 法により定量した。

4) CYP3A4 各変異型分子の MBI パラメーターの算出

代謝速度の対数とプレインキュベーション時間との関係から、各阻害剤濃度における酵素の不活性化速度定数 (k_{obs}) を求め、これから阻害剤非添加時の不活性化速度定数 (k_{inact(0)}) を差し引き Δk_{obs} とした。阻害剤濃度 [I] と Δk_{obs} との関係に、非線形最小二乗法を用いて Eq.2 をあてはめ、最大不活性化速度定数 (k_{inact}) および最大不活性化速度の 1/2 の不活性化をもたらす阻害剤の濃度 (K_i) を算出した。

$$\Delta k_{\text{obs}} = k_{\text{inact}} \cdot \frac{[I]}{[I] + K_i} \quad \text{Eq. 2}$$

[I]: 阻害剤濃度

5) CYP3A4 の各変異型分子種における基質と競合阻害剤の Docking simulation

CYP3A4 の各変異型分子種の結晶構造は protein data bank より、docking simulation ソフト

MOEにて、3次構造をモデリングした。そこに、基質TSTおよび各競合阻害剤をそれぞれ同時にドッキングを行いその相互作用エネルギーを用いて、安定性を評価した。

【結果・考察】

CYP3A4 分子種に対する競合阻害剤による代謝阻害の比較

ITCZとCMDはいずれも、TSTの6 β 水酸化活性を濃度依存的に阻害した。ITCZの K_i 値は、野生型と比較してCYP3A4.7において2倍以上高く、阻害強度が弱いことが示された。また、CYP3A4.2においては K_i 値が低く、阻害強度が強いことが示された。しかし、各分子種間でITCZの K_i 値に統計的な有意差は認められなかった(表1)。一方、CMDの K_i 値は、野生型と比較してCYP3A4.16で3倍以上高く、阻害強度が有意に減弱した。逆にCYP3A4.18においては、 K_i 値が3倍以上低く、阻害強度が有意に上昇した。なお、ITCZ、CMDいずれにおいても、基質の親和性(K_m 値)と阻害剤の阻害強度(K_i 値)との間に有意な相関はみられなかった。続いてCYP3A4各変異型分子種と両阻害剤および基質TSTのdocking simulationを行った結果、TSTとITCZはFig 1 (A)、(B)で示す位置で最も安定なエネルギー状態であり、CYP3A4.1と比べて、CYP3A4.7のヘムに対してITCZはTSTよりも接近しにくい状態であることが示唆され、 K_i 値の上昇(表1)を支持する結果であった。さらに、CMDの場合でもCYP3A4.16のシミュレーション結果も同様であった(data not shown)。それぞれの阻害剤のヘム鉄への接近しやすさ(accessibility)が変異型分子種において固有に変化していることが、阻害剤に対する阻害強度に差がみられた一因であると考えられた。

CYP3A4 分子種に対するMBI阻害剤による代謝阻害の比較

EM (Fig. 2)とCAMはいずれもTSTの6 β 水酸化活性をプレインキュベーション時間依存的に阻害した。またその不活性化速度は濃度依存的に増加した。各種変異型分子種に対するEMの k_{inact} は、CYP3A4.2、.7では、野生型の0.5倍となり、CYP3A4.16、.18では野生型とほぼ同等であった(data not shown)。一方EMの K_i 値は、CYP3A4.7、.18ではそれぞれ野生型の0.40倍、0.72倍と不活性化強度が上昇し、CYP3A4.2、.16では、それぞれ1.2倍、2.2倍と不活性化強度が減弱していた。また、CAMの k_{inact} は、変異によらずほぼ一定であった。一方、CYP3A4.2、.7、.18では、CAMの K_i 値がそれぞれ野生型の0.40倍、0.42倍、0.64倍と、不活性化強度が上昇していた。逆に、CYP3A4.16では、 K_i 値がそれぞれ野生型の2.4倍と、不活性化強度が減弱していた。本研究から、CYP3A4の野生型と各種変異型分子の間で、MBI阻害剤に対する感受性が異なることが明らかとなった。また、両阻害剤間で、それぞれの変異が阻害強度におよぼす影響は近似していた。変異型間で K_i 値に差が生じた原因は、MBI阻害剤自体の代謝キネティクスの違いや、生成した代謝物による酵素の不活性化キネティクスの違いなどが考えられる。

【総括】一般に代謝阻害を介した薬物間相互作用の程度には個人差があるとされているが、その要因の一つとして、阻害を受ける代謝酵素の遺伝子型により阻害剤に対する感受性が異なることが考えられる。

	<i>n</i>	K_i	
		ITCZ, nM	CMD, μ M
CYP3A4.1	5	76 (45.1-129)	370 (285-471)
CYP3A4.2	5	45 (30.7-65.7)	360 (334-392)
CYP3A4.7	5	180* (146-219)	230* (192-286)
CYP3A4.16	5	41 (17.1-99.8)	1200* (784-1790)
CYP3A4.18	5	82 (51.4-133)	140* (104-196)

Geometric mean (\pm 1 SD) for K_i . Values are expressed to two significant digits.* p <0.05 vs CYP3A4.1

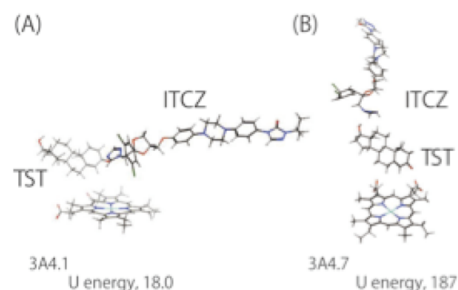


Figure 1 CYP3A4 分子種に対するTSTとITCZのdocking simulation (A)CYP3A4.1 (B)CYP3A4.7において、U energy18.0, 18.7で安定

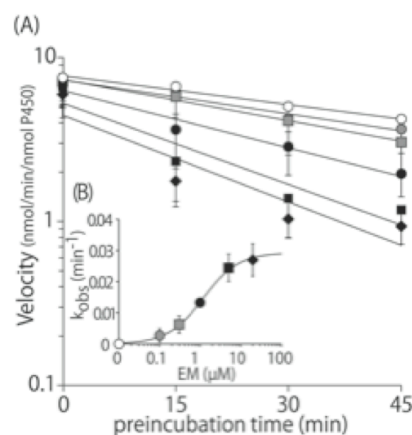


Figure 2. CYP3A4 野生型に対するEMのMBIプロファイル (A)EMの濃度およびプレインキュベーション時間依存的な阻害作用、(B)EMの濃度と k_{obs} との関係なお、EM濃度は、○:0 μ M, ●:0.1 μ M, ■:0.3 μ M, ◆:1 μ M, ▲:5 μ M, ◆:20 μ M mean \pm S.D., n=5

日本人関節リウマチ患者における Methotrexate の治療反応性に関する 要因の検討

医薬品情報学講座 望月眞弓 橋口正行

【背景】Methotrexate (MTX) は、関節リウマチ (RA) の治療においてアンカードラッグとして最も広く使用されている抗リウマチ薬 (DMARDs)である。しかし、RA 患者に対する MTX 治療反応性には個体差があり、性差および人種差も存在することが知られている。このような治療反応性の差の原因の一つとして、MTX 効果発現に重要である細胞内 MTX-ポリグルタメート (MTX-PGs) 濃度の違い、MTX の細胞内動態に関与する輸送担体および酵素の遺伝子多型が考えられている。しかしながら、日本人 RA 患者における MTX への治療反応性ならびに MTX に関与する輸送担体および酵素の遺伝子多型の報告は少ない。そこで、我々は日本人 RA 患者における MTX 輸送担体および酵素遺伝子の多型性、および疾患コントロールと MTX への治療反応性の関連性について検討を行った。

【方法】検討 1.日本人 RA 患者における RFC1、FPGS、GGH、ABCB1、ABCC2、ABCG2、MTHFR、DHFR、TYMS の遺伝子型頻度、性差及び人種差の評価

日本人 RA 患者 122 名(男性 31 名、女性 91 名)を対象とし、reduced folate carrier (RFC1)、folypolyglutamyl synthase(FPGS)、 γ -glutamyl hydrolase (GGH)、ABC transporters (ABCB1 3435C>T、ABCC2 IVS23+56T>C、ABCG2 914C>A)、5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR 1298A>C)、dihydrofolate reductase (DHFR 3'-UTR 829C>T)、thymidylate synthase (TYMS 3'-UTR(-6/+6))の遺伝子型頻度及び性差を評価した。また、PubMed(1963 年以降)を用いて、RA 患者において遺伝子型頻度の評価ならびに人種の明記がされている論文を収集し、人種差を検討した。遺伝子型の評価は末梢血から抽出した DNA を用い、real-time PCR 法にて行った。

検討 2. RA 患者における疾患コントロールと MTX への反応性との関連性の評価

検討 1 における RA 患者のうち、新たに MTX 投与が開始され 6 ヶ月間以上継続投与された患者 21 名(男性 3 名、女性 18 名)を対象とした。投与開始後 6～12 ヶ月の間に投与量に変更がなく、かつ月 1 度の評価の DAS28 のスコアが 2 を超えた評価日が 1 回以下の場合をコントロール良好とし、それ以外をコントロール不良とした。患者毎に 0～3 または 0～6 ヶ月までの累積投与量と DAS28 でのスコアの曲線下面積(DAS28-AUC)を求め、MTX への反応性の指標 R を以下の式より算出した。

$$R = \frac{\text{投与開始後 3 ヶ月又は 6 ヶ月間の DAS28 改善面積}}{\text{投与開始後 3 ヶ月または 6 ヶ月間の累積投与量}}$$

遺伝子型と mRNA 発現量の関連性は Kruskal-Wallis 検定、性差及び人種差は χ^2 検定、MTX への反応性と疾患コントロールの関連性は Mann-Whitney の U 検定を用いた。

【結果】検討 1.日本人 RA 患者 122 名に関する RFC1 80、GGH、ABCB1、ABCG2、MTHFR、TYMS の遺伝子型頻度は、既報の日本人 RA 患者の遺伝子型頻度と比べて統計学的な有意差は

認められなかった。日本人 RA 患者での遺伝子型頻度は、RFC1 -43 は T/T(21.3)、T/C(47.5)、C/C(31.1)、FPGS 1994 は G/G(45.9)、G/A(45.1)、A/A(9.0)、ABCC2 IVS23+56 は T/T(4.9)、T/C(36.9)、C/C(58.2)、DHFR 3'-UTR は C/C(55.7)、C/T(39.3)、T/T(4.9)であることが明らかとなった。また RFC1 80G>A、-43T>C との間に強い連鎖不均衡の存在が示された。性差に関しては、TYMS 3'-UTR(-6/+6)の遺伝子型頻度において認められ、-6/-6 型が男性に多かった($p=0.001$)。その他の輸送担体及び酵素の遺伝子型頻度には性差は認められなかった。人種差の評価に関しては、採択基準を満たした論文は 7 報であり、ABCC2 IVS23+56T>C、MTHFR 1298A>C、TYMS 3'-UTR(-6/+6)の遺伝子型頻度において、我々の日本人 RA 患者 122 名の結果と Caucasian との間に有意な差がみられた(各々 $p<0.001$)。

検討 2. RA 患者における疾患コントロールと MTX への反応性との関連性の検討では、投与開始後 0~3 ヶ月間について、累積投与量[median(25th-75th percentile)]はコントロール良好群 7 例で 96.0(94.0-116.0)、不良群 14 例で 118.0(100.0-124.0)であり、両群間で統計学的に有意な差は認められなかった。DAS28 改善面積は、良好群で 25.4(24.5-26.1)、不良群で 23.4(22.6-24.5)であり、良好群で大きく統計学的に有意であった($p=0.004$)。治療反応性 R は良好群で 0.25(0.22-0.27)、不良群で 0.20(0.19-0.24)であり、良好群で大きい傾向が認められた。また、投与開始後 0~6 ヶ月間について、累積投与量はコントロール良好群 7 例で 192.0(166.0-212.0)、不良群 14 例で 214.0(196.0-220.0)であり、両群間で統計学的に有意な差は認められなかった。DAS28 改善面積は、良好群で 51.0(49.7-52.2)、不良群で 47.6(45.1-48.4)であり、良好群で大きく統計学的に有意であった($p=0.001$)。治療反応性 R は良好群で 0.26(0.24-0.30)、不良群で 0.22(0.21-0.24)であり、良好群で大きく統計学的に有意であった($p=0.025$)。

RFC1 80G>A、FPGS 1994G>A、GGH -401C>T、MTHFR 1298A>C、TYMS3'-UTR(-6/+6)の遺伝子型と投与開始後 0~6 ヶ月間における治療反応性 R との関連性については、各輸送担体及び酵素の遺伝子型と治療反応性 R との間に有意な関連は認められなかった。

【考察】本研究により新たに日本人 RA 患者の複数部位の遺伝子型頻度が明らかとなった。TYMS 3'-UTR(-6/+6)の遺伝子型頻度において男性で-6/-6 型の頻度が有意に高かった。人種差に関しては、Caucasian と比較して ABCC2 IVS23+56T>C、MTHFR 1298A>C、TYMS 3'-UTR(-6/+6)の遺伝子型頻度が有意に異なり、これらの遺伝子型頻度の違いが MTX への治療反応性の性差、人種差の一因となっている可能性が考えられた。6 ヶ月以降の疾患コントロールと MTX への反応性との関連性の検討においては、疾患コントロール不良例に比べ、良好例では R が大きいことから、少ない投与量でコントロールが可能であると考えられた。しかし、MTX への治療反応性と遺伝子型との関連性については、明確な関連性は認められなかった。本研究では例数が少なかったため、今後例数を増やし、また MTX-PGs との関連性についても検討する必要があると考えられる。

なお、本研究は慶應義塾大学薬学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会にて承認された。