

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08596

研究課題名(和文)薬物-飲食物間相互作用の強度に個人差をもたらす遺伝的要因の解明

研究課題名(英文)Quantitative analysis of the factors that confer inter-individual variation of the extent of beverage-drug interactions

研究代表者

大谷 壽一 (Hisakazu, OHTANI)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授

研究者番号：70262029

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文):薬物代謝酵素 CYP3A4 の遺伝的 variants を用いた検討から、阻害剤の阻害特性に対して遺伝的変異をもたらす影響は、阻害剤の種類や、評価に用いる基質によって異なることが明らかとなった。また、CYP2C9 や CYP2C19 を用いた検討からは、飲食物に含まれるさまざまな阻害剤の阻害様式は、CYP3A4, 2C9, 2C19 といった isoform 間で様々であり、臨床的に寄与する阻害特性を考慮に入れた検討が必要であることがわかった。薬物トランスポータ OATP1A2 および OATP2B1 を用いた検討から、グレープフルーツジュース中に新規の阻害成分が含まれる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文):The influences of genetic variation of CYP3A4 on the inhibitory kinetics of its inhibitors varied among the inhibitors and affected by the probe substrate used. The inhibitor manners (patterns) of metabolic inhibitors contained in fruit juice are different among CYP isoforms, i.e. CYP3A4, 2C9 and 2C19. The research should be focused upon the mode of inhibition that is clinically most relevant. Using newly developed cell lines stably expressing a transporter OATP1A2 or OATP2B1, some unidentified inhibitory ingredient(s) for these transporters are considered to be contained in some fractions of grapefruit juice.

研究分野：臨床薬物動態学

キーワード：薬物相互作用 薬物代謝酵素 薬物トランスポータ 代謝阻害

1. 研究開始当初の背景

これまで、多くの研究者は、薬物相互作用の検討においては、その「平均値」を対象にしていた。しかし、実際には、薬物相互作用の程度には個人差が大きく、同じ臨床試験の条件であっても、顕著に薬物相互作用がみられる被験者と、あまりみられない被験者がいる。薬物相互作用の個人差要因は大きく三つに大別される。すなわち、被験者間の阻害剤の体内濃度の差異、ある動態プロセスにおける被阻害経路の寄与率の差異、および PK 関連機能タンパク質に対する阻害強度の差異である。薬物代謝の競合阻害であれば、阻害剤濃度 (I)、寄与率 (f_m) および阻害強度 (K_i) の個人差、となる。

研究代表者らは、PK 関連機能タンパク質の genetic variants 間での阻害強度の差異に着目して研究を行い、CYP3A4 の genetic variants 間で、競合的阻害剤や MBI (mechanism-based inhibition) 阻害剤の阻害強度 (K_i または K_i 値) が最大 5~10 倍異なることを示していた。

また、薬物相互作用の原因として、代謝酵素の阻害だけではなく、薬物輸送担体の阻害も徐々に注目され、同時に OATPs (organic anion transporting polypeptides) などのトランスポーターの遺伝的多型についても徐々に明らかにされつつあった。

しかし、これらの PK 関連機能タンパク質については、遺伝的変異がその機能に及ぼす影響についてはさまざまな研究結果が蓄積していたのに対して、遺伝的変異が各種阻害剤の阻害特性に及ぼす影響について、定量的な評価はほとんど行われていなかった。

2. 研究の目的

研究代表者らは、特に薬物の消化管吸収過程において PK 関連機能タンパク質の阻害を介して生ずる薬物-飲食物間の相互作用に着目した。中でも、CYP3A4、CYP2C9、CYP2C19、OATP1A2、OATP2B1 [当初予定は CYP3A4、MDR1、OATP1A2] の genetic variants に対する各種阻害剤 (飲食物・天然物由来の成分も含めて) の阻害特性の差異を定量的に明らかにするとともに、その臨床的意義を演繹的に明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) CYP3A4 variants における代表的競合阻害剤の阻害特性の体系的解析

野生型 CYP3A4 分子 (CYP3A4.1) および 4 種の変異型分子 (CYP3A4.2, .7, .16, .18) を、大腸菌発現系を用いて発現させ、CO difference spectra 法により酵素量を定量して実験に供した。酵素活性は、テストステロンの 6β 水酸化により評価した。常法に従い CYP3A4 発現ミクロソームと

NADPH 再生系を含む緩衝液に基質を添加し、一定時間後の代謝物の生成量を HPLC-UV 法により測定することで、代謝活性を評価した。さまざまな阻害剤濃度における基質濃度と酵素活性との関係に、非線形最小二乗法によりミカエリスメンテン式をあてはめ、阻害強度 K_i 値を算出した。阻害剤としては、ケトコナゾールおよびボリコナゾールを用い、過去のイトラコナゾールおよびフルコナゾールにおける結果と比較した。

さらに、イトラコナゾールの阻害作用に関しては、基質を他の典型的基質 (ニフェジピン、ミダゾラム) とした場合の特性についても解析した。

(2) CYP2C9 および CYP2C19 における天然物由来成分の阻害様式及び阻害活性の評価

(1) と同様、rCYP 発現系を用いて CYP2C9 野生型及び CYP2C19 野生型に対するベルガモチン (BG)、ジヒドロキシベルガモチン (DBG) およびレスベラトロール (RSV) の阻害様式および阻害強度を定量的に評価した。CYP2C9 のプローブ基質としてはワルファリン、CYP2C19 のプローブ基質としてはオメプラゾールを用い、それぞれ 7-OH 体および 5-OH 体の生成速度を測定することで、酵素活性を評価した。さまざまな阻害剤濃度における基質濃度と酵素活性との関係から時間非依存的阻害の特性 (競合、非競合、混合) を明らかにし、さらに MBI の有無を明らかにするために、さまざまな濃度の阻害剤存在下に、酵素残存活性のプレインキュベーション時間依存性を評価した。

(3) OATP1A2 および OATP2B1 野生型および変異型発現細胞の構築と機能評価

常法に従い、OATP1A2 および OATP2B1 cDNA をクローニングし、site-directed mutagenesis 法により変異を導入することで、これらの genetic variants を含むクローニングベクターを作成した。導入する変異は、アミノ酸変異を伴うヒトで既知の代表的変異とし、OATP1A2 については 38T>C, 382A>T, 404 A>T, 516 A>C, 559G>A, 2003C>G を、OATP2B1 については 43C>T, 601 G>A, 644 A>T, 935 G>A, 1175 C>T, 1457 C>T の、各 6 種とした。得られた CDS を発現ベクターに導入し lipofection 法により HEK293 細胞に導入し、一過性発現細胞を得た。続けて、当該遺伝子を安定発現ベクターに導入し、virusfection 法により HEK293 細胞に導入し、目的遺伝子を高発現するコロニーを、典型的基質の輸送活性に基づいて選択した。

輸送活性は、OATPs の典型的基質である estrone-3-sulfate の放射標識体の初期取り込み速度を、シリコンレイヤー法を用いて測定することで評価した。野生型 OATP1A2

および OATP2B1 の安定発現細胞の輸送活性の pH 依存性を pH6.0~7.4 の範囲で検討することで、機能を評価した。

4. 研究成果

(1) CYP3A4 variants における代表的競合阻害剤の阻害特性の体系的解析

各種 CYP3A4 variants に対する阻害強度の変動パターンは、ケトコナゾール (KCZ)、ボリコナゾール (VCZ)、フルコナゾール (FCZ) の 3 種間では近似していたものの、イトラコナゾール (ITCZ) ではこれら 3 種とは遺伝子変異の影響が異なって現れた。(図 1, 表 1)

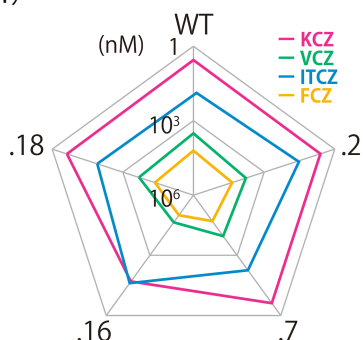


図 1. テストステロンを基質として用いたときの、CYP3A4 variants 間における 4 種のアゾール系抗真菌薬の阻害強度 (K_i 値) の比較

表 1. CYP3A4 variants 間における 4 種のアゾール系抗真菌薬の阻害強度 (K_i 値) の順位相関 (Spearman)

	VCZ	ITCZ	FCZ
KCZ	0.7	-0.2	0.9
VCZ		-0.3	0.9
ITCZ			-0.1

また、基質としてテストステロン (TST)、ニフェジピン (NIF)、ミダゾラム (MDZ) を用いると、それぞれの場合でイトラコナゾールによる阻害強度に対する遺伝子変異の影響が異なって表れることも示された。(図 2)

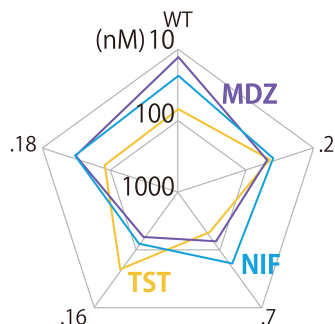


図 2. イトラコナゾールによる CYP3A4 の阻害強度 (K_i 値) に対する遺伝的 variants の影響パターンの、基質間比較

以上より、CYP3A4 の遺伝的多型は、薬物相互作用に個人差をもたらす一員であるが、遺伝子変異がもたらす影響のパターンは、構造が比較的類似した阻害剤間であっても異なること、また同じ阻害剤であっても、基質として何を用いるかによっても可能性が示された。

(2) CYP2C9 および CYP2C19 における天然由来成分の阻害様式及び阻害活性の評価

(2-1) CYP2C9

CYP2C9 に対する BG, DHB および RSV の阻害様式はそれぞれ、時間依存的 (MBI) 阻害と可逆的阻害の混合 (おもに競合阻害)、MBI 阻害、非競合阻害 (図 3) であった。DHB の阻害パラメータ K_i および $k_{inact,max}$ はそれぞれ $1.5 \mu\text{M}$, 0.0638 min^{-1} と算出された。これらの値は、CYP3A4 に対する阻害パラメータと比較すると、 K_i 値については同程度であったが、 $k_{inact,max}$ 値については $1/50$ と弱かった。BG および RSV においては、CYP3A4 に対する既知の阻害様式 (それぞれ MBI 阻害、MBI 阻害と可逆的阻害の混合) とは異なっていた。

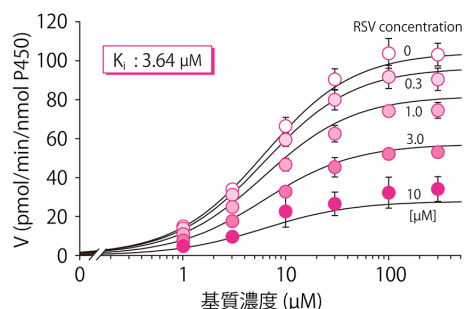


図 3. CYP2C9 に対するレスベラトロール (RSV) の阻害様式。非競合阻害を示すことがわかる。

(2-2) CYP2C19

CYP2C19 に対する BG, DBG および RSV の阻害様式は、CYP2C9 とは異なりいずれも時間依存的 (MBI) 阻害であった。得られた阻害パラメータを表 2 に示す。

表 2. CYP2C19 野生型酵素に対する各種天然果実成分の MBI 阻害パラメータ

	K_i (μM)	$k_{inact,max}$ (min^{-1})
BG	$k_{inact,max}/K_i = 0.0135$	
DHB	0.287	0.245
RSV	0.0482	3.27

なお、現在、CYP2C19 variants 発現大腸菌株 (CYP2C19.1A, .1B, .8, .10, .23) の構築が完了したため、一部発現量の少ない variants の培養条件の適正化を進めつつ、構築した variants を用いた阻害実験を実施して

いる。(未発表)

(3) OATP1A2 および OATP2B1 野生型および変異型発現細胞の構築と機能評価

OATP1A2 および OATP2B1 安定発現 HEK293 細胞株の構築を完了した。その発現及び機能はそれぞれ Western blotting および estron-3-sulfate の取り込み、果汁成分であるナリンギンによる阻害等により確認できた。OATP1A2 に対する飲食物成分の阻害としては、グレープフルーツジュースのメタノール画分およびアセトン画分に強い阻害活性を認めため、現在、阻害成分の分離同定を進めている。また、OATP1A2 においては基質取込みに顕著な pH 依存性が、OATP2B1 では low affinity site で pH 依存性が認められたのに対して、OATP2B1 の high affinity site では pH 依存性が認められなかった。

OATP1A2 遺伝的 variants 発現細胞の樹立については、38T>C, 559G>A, 2003C>G の 3 種の variants では HEK293 安定発現細胞における機能的発現が確認できた。382A>T, 404 A>T では蛋白レベルでの発現が確認できている。516 A>C については、ベクターは構築できているものの発現は確認できていない。

(4) まとめ

CYP3A4 における検討からは、遺伝的 variants による定量的な阻害特性への影響は、たとえ構造が類似した阻害剤間であっても異なること、また検討に用いる典型的基質によっても異なることが明らかとなった。したがって、薬物飲食物相互作用の個人差を考える上では、個々の阻害剤、基質ごとに緻密な検討を行っていく必要があると考えられた。また、CYP2C9, 2C19 を用いた検討からは、同じ飲食物由来の阻害剤であっても、CYP isoforms 間で阻害様式が異なる可能性が示された。また、複数の阻害様式がほぼ同じ阻害強度で寄与することもあることがわかった。したがって、薬物飲食物相互作用の個人差を考える上では、個々の阻害剤の各 CYP isoforms に対する阻害様式を定量的に比較していく必要があることが判明した。

OATP1A2 および OATP2B1 に関する検討では、現在までに実験系 (両トランスポーターの野生型および変異型の判定は告げん細胞) の確立が概ね目処が付き、グレープフルーツジュース中より新たな OATPs 阻害成分が見出される可能性が示された。今後は、既存及び新規の阻害剤について、異なる遺伝的 variants に対する阻害作用を定量的に検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)
(投稿準備中)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 関 博行, 秋好 健志, 今岡 鮎子, 大谷 壽二. CYP2C19 代謝活性に対する天然果実成分の阻害様式及びキネティクスの評価. 日本薬学会第 138 年会, (2018/3, 金沢)
- ② 川村 豪, 今岡 鮎子, 秋好 健志, 日比野 英幸, 荒木 拓也, 宮崎 光江, F.P Guengerich, 中村 克徳, 中村 智徳, 山本 康次郎, 大谷 壽一. CYP3A4 genetic variants に対する各種アゾール系抗真菌薬の阻害特性の比較. 日本薬学会第 137 年会, (2017/3, 仙台)
- ③ 内山 茉里夏, 秋好 健志, 今岡 鮎子, 大谷 壽一. グレープフルーツジュース成分および resveratrol の CYP2C9 阻害特性解析. 日本薬学会第 137 年会, (2017/3, 仙台)[優秀発表賞受賞]
- ④ 内藤 里菜, 秋好 健志, 今岡 鮎子, 日比野 英幸, 荒木 拓也, 宮崎 光江, F.P. Guengerich, 中村 克徳, 中村 智徳, 山本 康次郎, 大谷 壽二. CYP3A4 各変異型分子種の代謝活性に対する MBI 阻害剤の阻害強度の体系的比較. 日本薬学会第 136 年会, (2016/3, 横浜)
- ⑤ 綾 華奈子, 秋好 健志, 今岡 鮎子, 日比野 英幸, 荒木 拓也, 宮崎 光江, F.P. Guengerich, 中村 克徳, 中村 智徳, 山本 康次郎, 大谷 壽一. CYP3A4 遺伝的 variant に対する競合阻害剤の阻害特性の体系的比較. 第 53 回日本薬学会関東支部大会, (2015/11, 船橋)[優秀発表賞受賞]

ほかに 2018 年度発表予定演題複数あり。

[図書] (計 0 件) -

[産業財産権]
特になし

[その他]
ホームページ等 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大谷 壽一 (OHTANI, Hisakazu)
慶應義塾大学・薬学部・教授
研究者番号：70262029

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

秋好 健志 (AKIYOSHI, Takeshi)
慶應義塾大学・薬学部・専任講師
研究者番号：50399143

今岡 鮎子 (IMAOKA, Ayuko)
慶應義塾大学・薬学部・助教
研究者番号：10710957