

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18938

研究課題名(和文) 抗HIV薬ドルテグラビルのTDM実臨床応用に向けた薬物動態解析

研究課題名(英文) Pharmacokinetic analysis for TDM of anti-HIV drug dolutegravir.

研究代表者

津田 真弘 (Tsuda, Masahiro)

京都大学・薬学研究科・講師

研究者番号：10726813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗HIV薬のTherapeutic Drug Monitoring (TDM) 実臨床応用に向けた基礎的情報蓄積を目指し、インテグラーゼ阻害薬ドルテグラビルの薬物動態制御因子の同定を試みた。その結果、ドルテグラビルは薬物排出トランスポーターであるBCRPの基質となることを明らかにした。以上より、ドルテグラビルの薬物動態制御因子の一つとしてBCRPが関与していることが示唆され、将来的にヒト血液を用いた臨床研究への展開に向けて有用な基礎的知見を得た。

研究成果の概要(英文)：In current study, we tried to identify pharmacokinetic regulatory factors of the integrase inhibitor dolutegravir with the aim of accumulating basic information for Therapeutic Drug Monitoring (TDM) of anti-HIV drugs. As a result, it became clear that dolutegravir will serve as a substrate for BCRP, an efflux transporter. It was suggested that BCRP is involved as one of pharmacokinetic regulators of dolutegravir, and obtained a useful finding for the development to clinical studies using the human blood sample in the future.

研究分野：医療薬剤学

キーワード：抗HIV薬 TDM 薬物動態 個別化医療 エイズ LC/MS/MS アドヒアランス トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus: HIV) 感染患者は世界中で増加しており、日本では先進国の中でも特に増加が著しく、2014 年末には感染患者は約 25,000 人と報告されている (平成 26 年エイズ発生動向、厚生労働省)。一方で近年、抗 HIV 薬の開発は目覚ましく、従来の逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬に加え、新たな作用機序のインテグラーゼ阻害薬や CCR5 阻害薬といった多くの新薬が登場し、薬剤選択の幅は広がった。

HIV 感染症治療の成功への鍵は、継続した抗 HIV 薬の服薬と適切な血中濃度の維持と考えられている。なぜなら、血中濃度の上昇は抗 HIV 薬による副作用の増加につながり、患者の服薬アドヒアランスを低下させ、治療の成功率を減少させてしまう。また、血中濃度の低下は HIV の耐性獲得を促進し、治療の失敗につながる。さらに、薬剤耐性を獲得すると、他の作用機序を有する抗 HIV 薬への変更を余儀なくされ、結果として将来の薬剤選択の幅を狭めてしまうことになる。このように抗 HIV 薬の使用について適切な血中濃度の維持は重要であるが、抗 HIV 薬は薬物動態学的に複雑な挙動を示す薬剤でもある。新規インテグラーゼ阻害薬ドルテグラビルは、ヒトの代表的な代謝酵素である CYP3A4 や UGT1A1 によって代謝され、また、有機カチオントランスポーターや ABC トランスポーターなど種々のトランスポーターが排泄に関与することが示唆されているが、in vivo におけるこれら薬物動態制御因子の寄与は不明な点が多く、薬物相互作用や遺伝子多型が血中濃度に与える影響についての情報も不十分である。すなわち、ドルテグラビルの血中濃度を適切に維持するために、代謝酵素やトランスポーターといった薬物動態制御因子を解明し、それら遺伝子多型などの薬物動態に与える影響を明らかにすることは極めて重要と言える。

2. 研究の目的

抗 HIV 薬のうち、キードラッグの一つであり、かつ使用頻度の高いインテグラーゼ阻害薬ドルテグラビルを対象薬とし、培養細胞系や動物を用いた基礎的実験と医療機関における電子カルテからの臨床情報の融合により、実臨床での血中濃度モニタリングによる Therapeutic Drug Monitoring (TDM) の確立に向けて、ドルテグラビルの薬物動態学的特徴を明らかにすることを目的とする。その過程で、ドルテグラビルの体内動態に影響を与える薬物トランスポーターや薬物代謝酵素といった薬物動態制御因子を同定することにより、ドルテグラビルの血中濃度を至適範囲内に到達させる方法を模索し、HIV 感染患者の長期生存、生活の質 (QOL) の向上に貢献

することを目指す。

3. 研究の方法

(1) ドルテグラビルの細胞内濃度および血中濃度測定系の確立

細胞内濃度や血中濃度を測定するためのドルテグラビル定量系構築には LC/MS/MS を用いた。

ドルテグラビルを種々濃度で調製し、ヒト血清中に添加したスパイク検体を作製した。内部標準として用いるドルテグラビル-d4 を含有したアセトニトリルを用いて除タンパク処理するなどして精製した後、繰り返し測定することによって本測定系の真度、精度などを確認し、定量性を評価した。測定系の構築にあたり、妥当性を検証するために、厚生労働省「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」を参照した。

(2) ドルテグラビルの排泄に関わるトランスポーターの同定

薬物の排泄に関わる ABC トランスポーターの中で代表的な Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) の遺伝子である ABCG2 を発現プラスミド pcDNA3.1(+) に導入し、BCRP の発現プラスミドを作製した。このプラスミドをヒト胎児腎由来 HEK293 細胞にトランスフェクションすることで一過性に発現させた。ドルテグラビル溶液を一定時間インキュベーションすることで細胞内に取り込ませ、細胞内に蓄積したドルテグラビル量を定量し、Mock 細胞での蓄積量と比較した。さらに BCRP の特異的阻害剤である Ko143 で BCRP による輸送を阻害することによる細胞内ドルテグラビル蓄積量の変化を観察することで、排泄に関与するトランスポーターの同定を試みた。

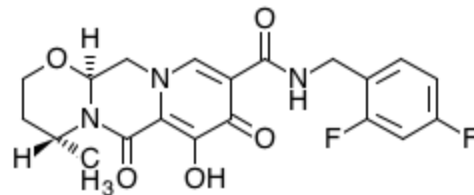


図 1: ドルテグラビル構造式

(3) BCRP 遺伝子多型 ABCG2 421C>A 発現プラスミドの構築

構築した野生型 BCRP 発現プラスミドに点突然変異を導入することで、BCRP の遺伝子多型として多くの報告がされており、BCRP の輸送活性にも影響を及ぼすとされている ABCG2 421C>A 発現プラスミドの作成を試みた。

4. 研究成果

(1) ドルテグラビル測定系の構築

ドルテグラビルの細胞内濃度や血中濃度を測定するため、文献検索を行い、HPLCによる分離条件およびMS/MSの測定条件についての情報を得た。その情報に基づいてLC/MS/MSにおけるドルテグラビル測定条件を作成し、最適化を行った。

ヒト血清中にドルテグラビルを種々濃度で添加したスパイク検体を測定したところ、図2のように血清中ドルテグラビル濃度と内部標準物質によって補正したドルテグラビルのピーク面積の間に良好な直線関係を持つ検量線を得ることが出来た。厚生労働省「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」に基づいて、定量下限や検量線について評価したところ、平均真度や精度などガイドラインに記載されている要件をほぼ満たす結果となったため、ドルテグラビルの測定系を構築できたと判断した。また、ヒト血清ではなく、HEK293細胞からの抽出液に種々濃度のドルテグラビルを添加したサンプルを用いても、良好な直線関係を持つ検量線を得られることを確認した。

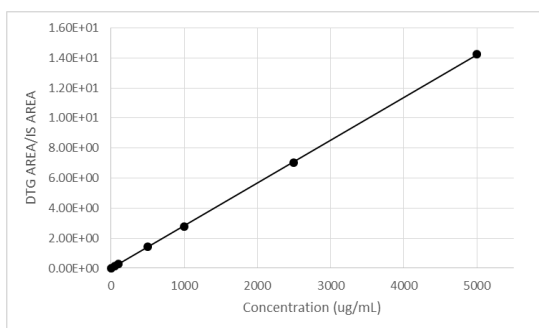


図2: ドルテグラビルの検量線

(2) BCRP を介したドルテグラビルの輸送

次に、HEK293細胞に薬剤排出トランスポーターであるBCRPを一過性発現させた系を用いてドルテグラビルの排出実験を行った。60分間ドルテグラビルをインキュベーションした後の細胞内ドルテグラビル蓄積量は、BCRP発現細胞においてMock細胞と比べて75%程度に減少した。さらに、BCRPの特異的阻害剤であるKo143存在下でドルテグラビルをインキュベーションした際のドルテグラビル細胞内蓄積量を観察すると、Mock細胞と同レベルまで細胞内蓄積量が回復した。これらの結果より、ドルテグラビルが弱いながらもBCRPの基質となり、BCRPによって排出される可能性があることが示唆された(図3)。

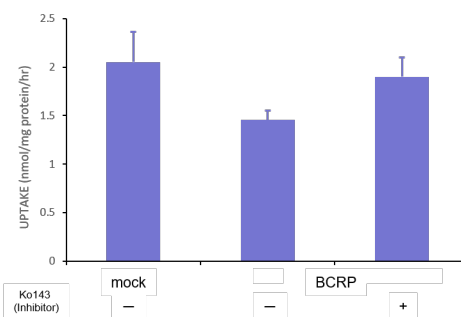


図3: BCRP一過性発現細胞におけるドルテグラビルの細胞内蓄積量

(3) BCRP 遺伝子多型 ABCG2 421C>A 発現プラスミドの構築

BCRPの主な遺伝子多型であるABCG2 421C>Aを野生型BCRPの配列を持つプラスミドに点突然変異を導入した。シーケンス解析を行うことで目的の変異が正しく導入されていることを確認した。今後、HEK293細胞に発現させ、輸送実験を行うことで、BCRPを介したドルテグラビル輸送への遺伝子多型の影響を観察することを計画している。

以上、本研究により、インテグラーゼ阻害薬ドルテグラビルの細胞内濃度及びヒト血中濃度を測定できる系を構築し、ドルテグラビルが薬物排出トランスポーターBCRPの基質となることを明らかにした。本研究成果は、将来的にヒト血液を用いた臨床研究や薬効との相関研究を行うにあたり、有用な基礎的情報になるものと考えられる。

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3件)

Yamashita F, Fujita A, Sasa Y, Higuchi Y, Tsuda M, Hashida M. An Evolutionary Search Algorithm for Covariate Models in Population Pharmacokinetic Analysis. J. Pharm. Sci., 査読有, 106(9), 2017, 2407-2411
DOI: 10.1016/j.xphs.2017.04.029

Otani Y, Yonezawa A, Tsuda M, Imai S, Nakagawa S, Omura T, Nakagawa T, Yano I, Matsubara K. Time-Dependent Structural Alteration of Rituximab Analyzed by LC/TOF-MS after a Systemic Administration to Rats. PLoS One, 査読有, 12(1), 2017, e0169588
DOI: 10.1371/journal.pone.0169588

松村 健吾、大谷 祐基、大村 友博、米澤 淳、津田 真弘、池見 泰明、中川 俊作、今井 哲司、中川 貴之、矢野 育子、吉貴 達寛、松原 和夫、LC/QTOF-MSによるフィルグラスチムバイオ後続品の定性・成分分析、医療薬学、査読有、42巻9号、2016、613-619
DOI: <https://doi.org/10.5649/jjphcs.42.613>

〔学会発表〕(計 7 件)

津田 真弘、大澤 史宜、山下 富義、参加・体験型実習内容の均等化を目指した2薬局体験型実務実習のトライアル調査、第27回日本医療薬学会年会、2017年11月3日～5日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

大谷 祐基、米澤 淳、津田 真弘、池見 泰明、今井 哲司、大村 友博、中川 俊作、中川 貴之、松原 和夫、LC/TOF-MSを用いた生体内におけるリツキシマブの構造変化の評価、第1回京都生体質量分析研究会シンポジウム、2017年2月7日、芝蘭会館(京都府京都市)

大谷 祐基、米澤 淳、今井 哲司、津田 真弘、池見 泰明、大村 友博、中川 俊作、中川 貴之、松原 和夫、Assessment of structural alterations of Rituximab in vivo and correlation with ADCC and CDC activities. 第26回日本医療薬学会年会、2016年9月17日～19日、京都国際会館(京都府京都市)

山嶋 仁実、寺尾 真琴、池見 泰明、津田 真弘、今井 哲司、永井 宏樹、松原 和夫、アファチニブ治療における治療継続と有害反応重篤化回避に対する継続的介入の重要性、第26回日本医療薬学会年会、2016年9月17日～19日、京都国際会館(京都府京都市)

津田 真弘、山下 富義、大澤 史宜、角山 香織、柴田 敏之、佐治 英郎、高倉 喜信、中山 和久、「医薬品開発プロジェクト演習」の開講とその評価～製薬会社の臨床開発職を体験する～、第1回日本薬学教育学会、2016年8月27日、28日、京都薬科大学(京都府京都市)

角山 香織、津田 真弘、糺谷 康子、山下 富義、フィジカルアセスメント実習の改善に向けた学生の理解度およびニーズの分析、第1回日本薬学教育学会、2016年8月27日、28日、京都薬科大学(京都府京都市)

都築 徹教、矢野 育子、中川 俊作、杉本 充弘、佐藤 裕紀、津田 真弘、上杉 美和、岡島 英明、海道 利実、上本 伸二、松原 和

夫、生体肝移植術後のタクロリムス静脈内投与から経口投与への切り替え換算量に関する検討、第33回日本TDM学会・学術大会、2016年5月28日、29日、栃木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 真弘 (TSUDA, Masahiro)
京都大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号: 10726813

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし