

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590668

研究課題名(和文) P450のMBIを介した薬物相互作用に個人差をもたらす遺伝的要因の定量的解明

研究課題名(英文) Quantitative analysis of genetic factors affecting the extent of drug interactions via mechanism based inhibition of cytochrome P450

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：薬物相互作用(くすりの飲み合わせ)の起こりやすさには個人差がある。特に、薬物相互作用の中でも、薬物酸化代謝酵素であるP450の不可逆的な阻害は、臨床上問題となっていることから、本研究では、P450の不可逆的な阻害を介した薬物相互作用のリスクが、遺伝的な要因によってどの程度影響を受けるかについて、さまざまな遺伝的変異型P450酵素分子(CYP3A4, 2D6変異型)を用いて、in vitro(試験管レベルの)酵素実験を行い、解析した。その結果、薬物代謝酵素の阻害を介した薬物相互作用は、さまざまな程度で、遺伝的要因の影響を受けることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：There seems to be considerable inter-individual variations in the extent of drug interactions, especially via the inhibition of oxidative metabolic enzymes, P450s. This study aimed to investigate quantitatively the influence of genetic variation of P450s, such as CYP3A4 and CYP2D6, on the extent of drug interaction in the in vitro studies using genetic variants. As a result of enzymatic study with probe substrates and mechanism-based inhibitors (MBI), we concluded that the inhibitory potencies of MBI differ among genetic variants. These results suggest that the genetic variation of metabolic enzymes affect the extent of drug interactions caused by their inhibitors, as well as the pharmacokinetics of their substrate drugs.

研究分野：臨床薬物動態学、医薬品情報学、薬物治療の情報科学

キーワード：薬物相互作用 個人差 テーラーメイド医療 不可逆的阻害 遺伝子多型

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 薬物相互作用回避の重要性

医薬品の有害反応（いわゆる副作用）は、全米における死因の五指に入るともいわれるほどの重大な問題である。そして、薬物相互作用は、回避可能な有害反応の 1/4 以上に関与しているとの報告もある。したがって、薬物相互作用を未然に予測して回避することは、現在に至るまで、医薬品の適正使用上、極めて重要な課題といえる。

### (2) 薬物相互作用の個人差とその要因

しかし多くの研究者は、薬物相互作用の予測においては、その「平均値」を対象にしていた。一方実際には、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。研究代表者らは以前からこの相互作用の個人差に注目し、「相互作用に個人差をもたらす要因」の究明に力を注いできた。そして例えば、阻害剤の消失を担う代謝酵素に誘導が生じたり、遺伝的多型があると、阻害剤の血中濃度に個人差を生じ、結果的に相互作用の大小に個人差をもたらす、という可能性を実証してきた。

薬物相互作用の原因として临床上最も重要なものに、代謝酵素の阻害による薬物血中濃度の上昇がある。特にチトクロム P450 (CYP) の阻害を介した相互作用は、現在でも臨床的に問題となっている。一方、P450 の中でも代表的な薬物代謝酵素の分子種である CYP3A4 や CYP2D6 等には、アミノ酸の置換を伴う遺伝的変異が存在し、変異型分子では酵素活性が変化している。同様に、変異型分子においては、阻害剤の阻害特性も変化しており、これが薬物相互作用の程度に個人差をもたらす要因となっている可能性が考えられていた。事実、CYP2D6 に関しては、東洋人に特異的な変異型分子である CYP2D6.10 では、競合的阻害剤の阻害強度が野生型とは異なっていることが報告されていた。また研究代表者らもこの点に着目し研究をすすめて、CYP3A4 の変異型分子 (CYP3A4.2、.7、.16、.18) においては、競合阻害剤に対する感受性が異なることを報告していた。

### (3) 代謝酵素の不可逆的阻害を介した相互作用の個人差

一方、酵素活性を不可逆的に失活させる mechanism-based inhibition (MBI) は、競合阻害とは異なり、阻害剤が体内から消失しても相互作用が遷延するという点で、競合阻害以上に問題となりやすい。臨床的には、CYP3A4 の阻害剤であるマクロライド系抗生物質やグレープフルーツジュース、CYP2D6 の阻害剤であるパロキセチンなど、MBI を引き起こすものが多数知られている。

しかしながら、CYP3A4 や CYP2D6 の野

生型分子と変異型分子の間における MBI 阻害剤の阻害特性の差については、研究開始当時は検討が行われておらず、ましてやその臨床的重要性についてはまったく情報がなかった。

### (4) IVIVE による相互作用の予測

また、*in vitro* 実験から得られた結果が、果たして臨床的にどの程度の意義を有するかを評価することも重要である。*in vitro* 実験の結果からヒトでの薬物体内動態を定量的に予測する、いわゆる *in vitro-in vivo* 補外 (IVIVE) は、研究開始時期と時を同じくしてファーマコメトリクスが発展したことから、生理学的母集団薬物動態シミュレータ (Simcyp™ など) による IVIVE の精度は格段に高まりつつあった。これにより、薬物相互作用を予測するための臨床試験をコンピュータ上 (*in silico*) で実現できることが認められつつあった。

## 2. 研究の目的

代表的な薬物代謝酵素である CYP3A4 および CYP2D6 を対象として、以下の 3 項目について検討を行うことを目的とした。

(1) CYP3A4 の野生型および変異型分子 (CYP3A4.1、.2、.7、.16、.18)、ならびに CYP2D6 の野生型および変異型分子 (CYP2D6.1、.2、.10) について、代表的な MBI 阻害剤 (CYP3A4 についてはマクロライド系抗生物質、柑橘果汁成分、ベラパミルなど、CYP2D6 についてはパロキセチン) の阻害特性を *in vitro* 酵素実験により評価する。

(2) Genetic variants 間で MBI の特性に差が生じるメカニズムについて酵素キネティクスの解析結果からの構造活性相関アプローチと、コンピュータによる *in silico* 分子ドッキングシミュレーションの二通りのアプローチを行う。

(3) 得られた阻害特性の差異が、临床上、薬物相互作用にどの程度の個人差をもたらす可能性があるかを、生理学的母集団薬物動態シミュレータ (Simcyp™) を用い、*in vitro-to-in vivo* 補外 (IVIVE) の手法により予測する。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料及び代謝実験の概要

酵素反応の評価は、研究代表者らの既報の方法 (Drug Metabol Dispos. 39: 724-728, 2011) に従って行った。CYP3A4 発現ミクロソームは、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、生成することにより作成した。酵素量は CO difference spectra 法により定量した。

酵素活性を評価するために 3 種の基質、すなわちミダゾラム、テストステロン、ニフ

エジピンを用い、それぞれ 1'-水酸化、6β水酸化、水酸化活性を評価した。常法に従い CYP3A4 発現マイクロソームと NADPH 再生系を含む緩衝液に基質を添加し、一定時間後の上記代謝物の生成量を HPLC-UV 法により測定することで、代謝活性を評価した。阻害剤としては、エリスロマイシン (EM)、クラリスロマイシン (CAM)、グレープフルーツジュース有機相抽出物、ベルガモチン (BG)、ジヒドロキシベルガモチン (DHB)、リモニン、レスベラトロール、ペラパミル (VER)、ノルペラパミル (NOR) などを対象とした。

CYP2D6 の野生型 (CYP2D6.1) および変異型 (CYP2D6.2, .10) 酵素は、市販のパキキュロウイルス発現系マイクロソームを用いた。酵素活性は、デキストロメトルファン の O-脱メチル化により評価し、代謝物は HPLC-蛍光法を用いて測定した。阻害剤としては、MBI 阻害剤としてパロキセチンを、非 MBI 阻害剤の陰性対照としてテルピナフィンを用いた。

## (2) 阻害剤の酵素阻害パラメータの算出

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、酵素の不活性化速度定数と阻害剤の濃度との関係に、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、最大不活性化速度  $k_{inact,max}$  および最大不活性化速度の 1/2 を与える阻害剤の濃度  $K_i$  を算出した。また、プレインキュベーションを行わない条件において、代謝活性に対する阻害剤の影響を検討することで、競合阻害における阻害定数  $K_i$  も併せて求めた。

## (3) 生理学的母集団薬物動態シミュレータによる IVIVE

生理学的母集団薬物動態シミュレータとしては Simcyp™ (<http://www.simcyp.com>) を用いた。CYP3A4 及び CYP2D6 の各変異型の homozygote からなる仮想日本人母集団を想定し、*in vivo* における代謝阻害 (薬物相互作用) のシミュレーションを行った。基質、阻害剤、変異の組み合わせ毎に、基質と MBI 阻害剤の併用による基質薬物の血中濃度 (AUC) 上昇率とそのバラツキをシミュレーションすることで、薬物相互作用の個人差要因としての代謝酵素の変異の臨床的意義を評価した。

また、paroxetine の自己 MBI 阻害パラメータをもとに、臨床で観測された非線形薬物動態を IVIVE により再現可能か、検証を行った。

## 4. 研究成果

### (1) CYP3A4 variants に対する各種 MBI 阻害剤の阻害特性 (図 1)

いずれの MBI 阻害剤においても、5 種の CYP3A4 variants に対する MBI 阻害特性

( $K_i$  値および  $k_{inact,max}$  値) は、variants 間で大きく異なっていた。

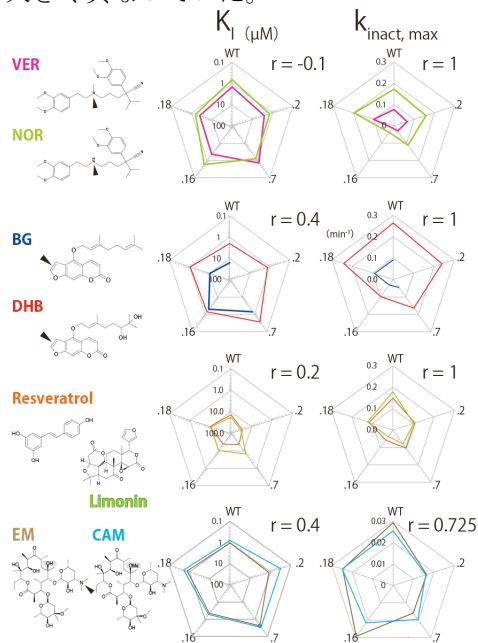


図 1. CYP3A4 variants に対する各種 MBI 阻害剤の阻害特性 (レーダー図としてまとめたもの)

そして、特定の variants が MBI 阻害を受けにくい受けやすいということはなく、遺伝子変異の影響は検討した MBI 阻害剤ごとに異なっていた。しかし、 $k_{inact,max}$  値 (最大不活性化速度) に対する遺伝子変異の影響は、構造が類似した MBI 阻害剤間では類似していた。そこでその一因として、CYP3A4 では遺伝的変異により酵素分子の構造が変化し、活性部位への基質や阻害剤の accessibility が変化している可能性を考え、*in silico* docking simulation による検討を行ったが、観測された結果を説明するに十分な結果を得ることはできなかった (data not shown)。

また、EM による CYP3A4 の MBI 阻害特性について、プローブ基質を変えて特性を検討したところ、最大の 1/2 の不活性化をもたらす阻害剤濃度 ( $K_i$ ) は三基質間で同等の値が得られたが、最大不活性化速度定数 ( $k_{inact,max}$ ) は NIF が TST よりも 1.44 倍有意に高く、MBI 特性は用いる基質によって異なって観測される可能性が示された。また、CYP3A4 の酵素活性は、EM との preincubation 時間に対して二相性に低下し、一定時間経過後は不活性化が進まず、一定の残存活性がある可能性も示された。現在この点について引き続き検討を進めている。

### (2) CYP2D6 variants に対する各種 MBI 阻害剤の阻害特性

陰性対照の非 MBI 阻害剤 (競合阻害剤) として用いたテルピナフィンについて、その阻害強度に variants 間で顕著な差異が認められた。すなわち、CYP2D6.1, .2, .10 に対

する競合阻害の  $K_i$  値はそれぞれ 0.0525, 0.355 および 1.85  $\mu\text{M}$  であり、野生型と CYP2D6.10 の間で 32 倍も感受性が異なっていた。これまでも同様の感受性の違いが他の阻害剤について報告されていたが、最大でも 10 倍程度の違いしか認められていなかった。テルビナフィンによる薬物相互作用は、CYP2D6 の遺伝子型による影響を非常に顕著に受ける可能性が示唆されたといえる。

一方、パロキセチンの CYP2D6 各種 variants に対する MBI 特性 ( $k_{\text{inact,max}}$  および  $K_i$  値)、ならびに CYP2D6 を介した自身の代謝特性を評価した。さらに、得られた実験結果 (自己 MBI パラメータ) を使用することで、Simcyp を用いた IVIVE により、パロキセチン連続投与時の非線形薬物動態を、平均値のみならず、分散も含めて良好にシミュレーションすることができた (図 2, 3)。

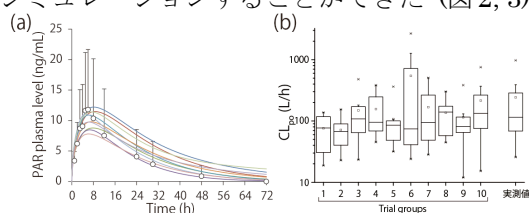


図 2. PAR 20 mg 単回経口投与時の PAR の (a) 血漿中濃度推移と (b)  $CL_{po}$  の予測

(a) 各実線 (10 本) は各 Simulation の平均値を示す。白丸は実測値の mean  $\pm$  S.D. を示す。(b)  $n = 8 \times 10$  trial の予測値 (左 1~10) と実測値 (右端)

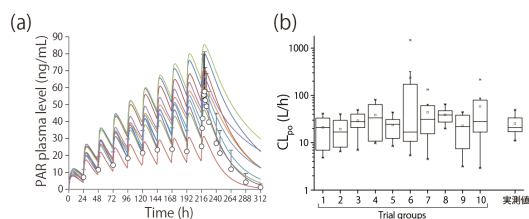


図 3. PAR 20 mg 反復経口投与時の PAR の (a) 血漿中濃度推移と (b)  $CL_{po}$  の予測

(a) 各実線 (10 本) は各 Simulation の平均値を示す。白丸は実測値の mean  $\pm$  S.D. を示す。(b)  $n = 8 \times 10$  trial の予測値 (左 1~10) と実測値 (右端)

### (3) まとめ

薬物代謝酵素における MBI 阻害の受けやすさは、variants 間で大きく異なっていた。したがって、MBI を介した薬物相互作用や、自己 MBI に基づく非線形薬物動態は、代謝酵素の遺伝子多型の影響を受けると考えられた。また、その影響は阻害剤間でも異なっていた。Variants 間で阻害特性に差が生じた原因については、構造が類似している阻害剤間では遺伝子多型の影響パターンが類似していたことから、基質や阻害剤の酵素活性中心への accessibility の違いが考えられたが、*in silico* ドッキングシミュレーションではこれを定量的に支持する計算結果は得られなかったことから、accessibility 以外の要因についても考慮する必要があると思われる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Akiyoshi T, Ishiuchi M, Imaoka A,

Ohtani H, Variation in the inhibitory potency of terbinafine among genetic variants of CYP2D6. Drug Metabol Pharmacokin 印刷中, 2015 (査読あり)

- ② Akiyoshi T, Ito M, Murase S, Miyazaki M, Guengerich FP, Nakamura K, Yamamoto K, Ohtani H, Mechanism-based inhibition profiles of erythromycin and clarithromycin with cytochrome P450 3A4 genetic variants. Drug Metabol Pharmacokin 28(5): 411-415, 2013 (査読あり)  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/dmpk/28/5/28\\_DMPK-12-RG-134/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/dmpk/28/5/28_DMPK-12-RG-134/_pdf)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 綾華奈子, 小林由季, 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 variants に対する各種競合阻害剤の阻害特性の比較. 日本薬学会第 135 年会 (2015/03, 神戸)
- ② 秋好健志, 大橋拓人, 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. 各種 CYP3A4 変異型分子種に対するベラパミルおよびその代謝物の MBI 特性. 日本薬学会第 135 年会 (2015/03, 神戸)
- ③ 石川裕子, 秋好健志, 今岡鮎子, 大谷壽一, CYP3A4 の Mechanism-based inhibition は基質依存的に生じるか. 医療薬学フォーラム 2014 第 22 回クリニカルファーマシーシンポジウム (2014/06, 東京)
- ④ 石内美帆, 秋好健志, 今岡鮎子, 大谷壽一. Terbinafine の CYP2D6 阻害特性に対する CYP2D6 遺伝子変異の影響. 日本薬学会第 134 年会 (2014/3, 熊本)
- ⑤ 小縣淳子, 秋好健志, 今岡鮎子, 日比野英幸, 荒木拓也, 宮崎光江, Guengerich F.P., 中村克徳, 中村智徳, 山本康次郎, 大谷壽一. CYP3A4 変異型分子種における testosterone 及び midazolam の代謝に対する競合阻害剤の阻害強度の比較. 日本薬学会第 134 年会 (2014/3, 熊本)
- ⑥ 丹羽しおり, 秋好健志, 今岡鮎子, 大谷壽一. *In vitro* データをもとにした、CYP2D6 variants における paroxetine の非線形体内動態の予測. 日本薬学会第 134 年会 (2014/3, 熊本) [年会優秀発表受賞]

- ⑦ 秋好健志, 今岡鮎子, 日比野英幸, 荒木拓也, 宮崎光江, Guengerich F. P., 中村克徳, 中村智徳, 山本康次郎, 大谷壽一. 各種 CYP3A4 変異型分子に対するグレープフルーツ果汁抽出物およびその成分の MBI 特性. 日本薬学会第 134 年会 (2014/3, 熊本) [年会ハイライト講演選定]
- ⑧ 鈴木恵美, 日比野英幸, 秋好健志, 村瀬沙織, 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. 果実成分による CYP3A4 の MBI 阻害特性に対する遺伝子変異の影響. 日本薬学会第 133 年会 (2013/3, 横浜)

## 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

山本 康次郎 (YAMAMOTO, Koujirou)  
群馬大学医学部・教授  
研究者番号：70174787

### (3) 連携研究者

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

山崎 浩史 (YAMAZAKI, Hiroshi)  
昭和薬科大学薬学部・教授  
研究者番号：30191274