

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860100

研究課題名(和文)薬物動態学的アプローチに基づく経口関節リウマチ分子標的薬の個別化投与設計

研究課題名(英文) Individual dose of tofacitinib based on pharmacokinetic and pharmacogenomic analysis

研究代表者

平 大樹 (Hira, Daiki)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：50636959

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)：トファシチニブは関節リウマチ治療における分子標的薬として初めての経口投与製剤である。本研究計画ではトファシチニブの個別化投与指針構築を目指し、これまでの関節リウマチ分子標的薬の主流であった注射剤では障壁とならなかった経口投与時の消化管吸収に関するトランスポーターの影響を評価した。

本研究期間においては、高速液体クロマトグラフ法による定量法の構築に加え、トランスポーター発現細胞系を用いた薬物輸送実験により、P-糖タンパク質(P-gp)や乳癌耐性タンパク質(BCRP)の基質となることを見いだした。さらに本薬剤投与患者を対象とした薬物血中濃度及びトランスポーターの遺伝子多型解析を実施している。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study is to develop the individual dose of tofacitinib, which is a novel synthetic disease modifying anti-rheumatic drug (DMARD) that selectively inhibits Janus kinase (JAKs), particularly JAK1 and JAK3. In the present study, a novel and simple HPLC-UV assay method for the estimation of tofacitinib concentration has been developed and validated. Transport characteristics of ABCB1 (P-glycoprotein, P-gp) and ABCG2 (breast cancer resistance protein, BCRP) were assessed by HEK293 cells stably expressing ABCB1 and ABCG2. The cellular accumulation of tofacitinib in HEK293-ABCB1 and HEK293-ABCG2 were markedly decreased than that in HEK293 cell as a control. These findings suggest that pharmacogenomic analysis help to optimize the individual dose of tofacitinib.

研究分野：医療薬学

キーワード：個別医療 トファシチニブ 薬物動態 関節リウマチ

1. 研究開始当初の背景

分子標的薬は疾患に関連する特定の分子のみを標的としてその活性を制御することで薬効を示すものであり、正常組織への障害性が低いとされる。しかしながら、分子標的薬はその標的以外の分子にも結合活性を有する可能性が報告されており (Karaman, Nat. Biotechnol., 2008)、分子標的抗がん剤である上皮成長因子受容体 (EGFR) 阻害剤による皮疹、間質性肺炎や血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 阻害剤による高血圧、消化管穿孔など、開発段階では予想が困難な毒性が生じている。さらに、実臨床における多様な背景を有する患者群では、治験段階とは異なり個体間変動が大きいと見られ、市販後の実臨床における臨床薬理学的研究は必須と言える。関節リウマチ治療における分子標的薬として、初めての経口投与と製剤であるトファシチニブは注射による疼痛や頻回の来院によるストレスを軽減できることから、関節リウマチ患者の QOL を向上させる新たな選択肢として期待されている。一方で、ヤヌスキナーゼ阻害という新規の作用機序に起因する未知の副作用など、安全性への懸念が取りざたされており、厳格な適正使用が求められている。一方で、本薬剤の治療効果・副作用に与える患者背景因子に関する情報は不足しており、有効かつ安全な投与設計指針は構築されていない。

以上のような背景から、経口分子標的抗がん剤の効果および副作用の予測、管理を目的に薬物血中濃度モニタリング (TDM) が行われている。慢性骨髄性白血病治療薬であるイマチニブでは、その血中濃度と治療効果の関連が示されており (Picard, Blood, 2007)、その臨床的意義が認められ、本邦では平成 24 年 4 月に特定薬剤治療管理料 (TDM の診療報酬) の請求対象薬物となった。また、イマチニブの血中濃度と治療効果は消化管に発現するトランスポーターである Brest Cancer Resistance Protein (BCRP) の遺伝子多型により影響される。さらに、BCRP はゲフィチニブやエルロチニブ、スニチニブの血中濃度、治療効果にも影響を与えることが報告されており (Noguchi, Adv. Drug Deliv. Rev., 2009)、消化管のトランスポーターは患者間の治療効果や副作用の個体差を生む原因となっている。

一方、がん治療だけでなく、関節リウマチ治療においても分子標的薬の適応は広がっており、症状の緩和を目標とした従来治療を大幅に改善し、寛解を目標とした治療を可能としている (Upchurch, Rheumatology, 2012)。しかしながら、従来の分子標的抗リウマチ薬の投与経路はすべて静脈内または皮下注射であり、煩雑な投与方法や頻回の来院など患者の負担が大きかった。そこで登場したのが、経口投与可能な分子標的抗リウマチ薬、トファシチニブである。本薬剤は有用性が期待される一方で、上述の経口分子標的

抗がん剤と同様に、トランスポーターを介した体内動態の個体差や副作用等の発生が懸念される。また、本薬剤は日本及び米国では承認されているが、同時期に承認申請を行った欧州では、安全性の観点から承認が保留されており、安全性には細心の注意を要する。このようなハイリスク薬にこそ、科学的基盤に基づいたきめ細やかな処方設計が求められる。

2. 研究の目的

本研究計画では、経口抗関節リウマチ分子標的薬であるトファシチニブの個別化投与指針の構築を目指し、これまでの関節リウマチ分子標的療法の主流であった注射剤では障壁とならなかった経口投与時の消化管吸収に関するトランスポーターの影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) トファシチニブの定量法の構築

トファシチニブの定量には、高速液体クロマトグラフ (HPLC-UV) 法を用いた。サンプルの前処理は後述の通りとした。トファシチニブ含有サンプルに対し、内標準物質 (スニチニブ) を一定量添加する。蛋白を除去するため、等量のアセトニトリルを加えて十分に攪拌後、遠心した上清を全量分取し、65°C、大気パージ下で溶媒を完全留去した。残渣に対し、20 mM リン酸緩衝液を加えて再溶解し、0.45 μm のフィルターで濾過したものを HPLC 用サンプルとした。

水系移動相には 20 mM リン酸緩衝液 (pH2.5) を用い、有機溶媒系移動相にはアセトニトリルを用い、グラジェントシステムにより溶出時間を制御した。トファシチニブ及びスニチニブの検出波長はそれぞれ 290 nm、423 nm とした。

2) トランスポーター安定発現細胞の構築と薬物蓄積性評価

HEK293 細胞に対し、ABCB1 及び ABCG2 をコードする配列を有するプラスミドを Lipofectamine により導入し、各々の基質となる薬剤 (ピンラスチン、SN-38) の存在下で培養を行い、各々の薬剤に耐性を示す細胞のみを選択することにより、各トランスポーターの安定発現細胞を構築した。

構築した安定発現細胞及び対象として用いた HEK293 細胞を播種したプレートに、トファシチニブ溶液を添加し、一定時間後の細胞内蓄積薬物濃度を定量した。併せて、各トランスポーターの阻害剤 (ベラパミル、ko134) 併存時の細胞内蓄積性についても評価を行った。

3) トファシチニブ服用患者を対象とした臨床薬物動態学的研究

トファシチニブを通常用量 (1日1-2回、5-10mg) で投与された関節リウマチ患

者を対象として、文書による同意取得を行い、薬剤投与後の1-3時間及び次回投与前(12-24時間)の採血を実施し、血漿中薬物濃度を測定した。また、別に採血した検体から、Taqman PCR法により、各トランスポーターの遺伝子多型を解析した。腎機能、肝機能、併用薬剤などの患者情報は電子カルテより抽出した。さらに関節リウマチの病態スコア(ACR20反応率、DAS-28)についても継続的に評価した。

4. 研究成果

1) トファシチニブの定量法の構築

HPLC-UV法により得られたトファシチニブの検量線は、2.5-80 ng/mLの範囲で高い直線性($R^2 > 0.99$)を示し、主薬剤と内標準物質とのピークの分離も良好であった。検量線範囲内で作成した標準溶液を測定した際の真度及び精度はいずれも誤差10%以下であり、良好な定量性を示した。

2) トランスポーター安定発現細胞の構築と薬物蓄積性評価

各トランスポーター導入細胞は、各々の基質となる薬物(ピンラスチン、SN-38)に対して耐性を示したことに加え、ウエスタンブロットにおいて、該当する分子量の単一バンドが確認されたことから、各トランスポーターが安定発現していることが確認された。各トランスポーター安定発現細胞を用いたトファシチニブの蓄積性評価から、ABCB1及びABCG2発現細胞では、非発現細胞に比較して、細胞内蓄積薬物量がそれぞれ40%、60%にまで低下した。また、各々の阻害薬併存時では、蓄積薬物量はほぼ100%となったことから、トファシチニブはABCB1及びABCG2の基質となることが示唆された。

3) トファシチニブ服用患者を対象とした臨床薬物動態学的研究

滋賀医科大学医学部附属病院に通院中の患者でトファシチニブを処方された患者について、同意取得の上、血中濃度測定及び遺伝子多型解析を実施し、副作用や治療効果(疾患マーカー)との関連を調査中であるが、当初の予定よりも患者の導入が遅れているため、引き続き研究を継続する。

以上、本研究では、HPLC-UVを用いたトファシチニブの定量法の構築に成功するとともに、トランスポーター発現細胞系を用いた薬物輸送実験から、消化管吸収の障壁となり得るP-糖タンパク質(ABCB1)や乳癌耐性タンパク質(ABCG2)の基質となることを明らかとした。さらに、実臨床におけるトランスポーターの影響を明らかとするため、本薬剤投与患者を対象とした血中濃度測定

及びトランスポーター遺伝子多型解析を継続している。今後、更なる情報の集積により、経口の分子標的抗リウマチ薬であるトファシチニブの科学的根拠に基づく投与指針の構築に繋がることが期待される。

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7件)

1. Sugimoto M, Ban H, Hira D, Kamiya T, Otsuka T, Inatomi O, Bamba S, Terada T, Andoh A. CYP3A4/5 genotype status and outcome of vonoprazan-containing Helicobacter pylori eradication therapy in Japan. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 45 (7), 1009-1010 (2017). doi: 10.1111/apt.13959. (査読有)
2. Koide H, Hira D, Tsujimoto M, Katsube Y, Minegaki T, Uzu T, Ikeda Y, Morita S, Nishiguchi K, Terada T. Previous Dosage of Allopurinol Is a Strong Determinant of Febuxostat Efficacy. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 40 (5), 681-686 (2017). doi: 10.1248/bpb.b16-00972. (査読有)
3. Hira D, Komase Y, Koshiyama S, Oguma T, Hiramatsu T, Shiraki A, Nishikawa M, Nakanishi M, Tsuji T, Matsumoto H, Ichimura K, Iwanaga T, Morikawa M, Yasuba H, Sugaya F, Arakawa Y, Kobayashi Y, Kato T, Futamura Y, Tsuji F, Terada T. Problems of elderly patients on inhalation therapy: Difference in problem recognition between patients and medical professionals. *Allergology International*. 65 (4), 444-449 (2016). doi: 10.1016/j.alit.2016.04.002. (査読有)
4. Noda S, Hira D, Kageyama S, Jo F, Wada A, Yoshida T, Kawachi A, Morita SY, Terada T. Pharmacokinetic Analysis of a Hemodialyzed Patient Treated With Pazopanib. *Clinical Genitourinary Cancer*. 14 (4), e453-456 (2016). doi: 10.1016/j.clgc.2016.03.016. (査読有)
5. Hira D, Chisaki Y, Noda S, Araki H, Uzu T, Maegawa H, Yano Y, Morita SY, Terada T. Population Pharmacokinetics and Therapeutic Efficacy of Febuxostat in Patients with Severe Renal Impairment. *Pharmacology*. 96 (1-2), 90-98 (2015). doi: 10.1159/000434633. (査読有)
6. Hira D, Koshiyama S, Komase Y, Hoshino N, Morita S, Terada T. Dry

mouth as a novel indicator of hoarseness caused by inhalation therapy. *J. Asthma*, 52(3), 296-300 (2015). doi: 10.3109/02770903.2014.971965. (査読有)

7. Noda S, Otsuji T, Baba M, Yoshida T, Kageyama S, Okamoto K, Okada Y, Kawauchi A, Onishi H, Hira D, Morita SY, Terada T. Assessment of Sunitinib-Induced Toxicities and Clinical Outcomes Based on Therapeutic Drug Monitoring of Sunitinib for Patients With Renal Cell Carcinoma. *Clinical Genitourinary Cancer*. 13 (4), 350-358 (2015). doi: 10.1016/j.clgc.2015.01.007. (査読有)
8. Saita T, Yamamoto Y, Noda S, Shioya M, Hira D, Andoh A, Morita SY, Terada T, Shin M. Quantification of Sorafenib in Human Serum by Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 38 (11), 1788-1793 (2015). doi: 10.1248/bpb.b15-00484. (査読有)

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 平 大樹, 小出博義, 山口将史, 森田真也, 西口工司, 中野恭幸, 寺田智祐: 本邦で入手可能な全ての吸入剤に対応する吸入パターン測定装置の開発, 日本薬学会 第 137 年会, 2017 年 3 月 26 日 (仙台)
2. 平 大樹, 上島 智, 伊藤英樹, 小澤友哉, 堀江 稔, 桂 敏也, 寺田智祐: 経口抗凝固薬の副作用と血中薬物濃度に及ぼす薬物動態関連遺伝子多型の影響, 第 33 回滋賀医大シンポジウム, 2017 年 2 月 21 日 (大津)
3. 平 大樹, 野田哲史, 磯野哲一郎, 赤羽理也, 池田義人, 森田真也, 寺田智祐, ファーマコゲノミクス検査に基づく個別化薬物療法実現のための院内基盤構築とその運用状況, 第 37 回日本臨床薬理学会学術総会, 2016 年 12 月 1 日 (米子)
4. Hira D, Noda S, Chisaki Y, Maruo Y, Uzu T, Morita S, Takeuchi Y, Maegawa H, Ikushiro S, Yano Y, Terada T: Pharmacogenomics, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of antihyperuricemic drug, 第 10 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2016 年 11 月 5 日 (前橋)
5. Hira D, Terada T: Pharmacometrics in clinical practice: Population PK analysis of febuxostat in patients with severe renal impairment, The 2nd A3

Pharmacometrics Symposium, October 14, 2016 (Daejeon, Republic of Korea)

6. 平 大樹, 寺田智祐: 院内における PG × 検査の体制構築に向けた取組みについて, 第 26 回日本医療薬学会年会, 2016 年 9 月 17 日 (京都)
7. 平 大樹, 小出博義, 中村茂巳, 岡田豊子, 石関一則, 山口将史, 腰山節子, 小熊哲也, 伊藤加代子, 船山さおり, 駒瀬裕子, 森田真也, 西口工司, 中野恭幸, 寺田智祐: 吸入剤の適正使用に向けた吸入パターン測定装置の開発と応用, 第 2 回日本医薬品安全性学会学術大会, 2016 年 7 月 24 日 (岐阜)
8. 平 大樹, 野田 哲史, 地寄 悠吾, 丸尾良浩, 宇津 貴, 森田 真也, 竹内 義博, 前川 聡, 矢野 義孝, 寺田 智祐: 高尿酸血症治療薬フェブキソスタットの薬物動態と治療効果に与える遺伝子多型の影響, 第 33 回日本 TDM 学会・学術大会, 2016 年 5 月 29 日 (宇都宮)
9. Hira D, Koshiyama S, Komase Y, Hoshino N, Morita S, Terada T: Hoarseness caused by inhalation corticosteroids is accelerated by dry mouth, 7th Asian Association of School of Pharmacy Conference, November 2015 (Taipei, Taiwan)
10. 平 大樹, 小熊哲也, 腰山節子, 堀江健夫, 吉村千恵, 百瀬泰行, 白木晶, 寺田智祐, 駒瀬裕子: 全国規模でのアンケート調査からわかる高齢者への吸入指導時の問題点, 第 25 回日本医療薬学会年会, 2015 年 11 月 (横浜)
11. 平 大樹, 永井智宏, 小熊哲也, 寺田智祐, 中野恭幸: 滋賀吸入療法連携フォーラム (SKR) の取り組みとチーム医療, 第 17 回日本看護医療学会学術集会, 2015 年 10 月 (福井)
12. 平 大樹, 寺田智祐: 経口関節リウマチ分子標的薬の薬物動態影響因子の探索, 平成 26 年度学長裁量経費による研究助成成果発表会, 2015 年 7 月 (大津)
13. 平 大樹, 腰山節子, 駒瀬裕子, 池田義人, 星野伸夫, 森田真也, 寺田智祐: 安静時唾液量の低下は吸入剤による嚔声の発生を増加させる, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 (神戸)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平 大樹 (HIRA DAIKI)

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号: 50636959

(2)研究協力者

寺田 智祐 (TERADA TOMOHIRO)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：10324641