

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08066

研究課題名(和文) 標的細胞内の薬動力学変化に起因する薬剤抵抗性に個人差をもたらす因子の解明

研究課題名(英文) Drug resistance caused by intracellular pharmacokinetics

研究代表者

山本 康次郎 (YAMAMOTO, KOUJIROU)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70174787

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)：抗HIV薬であるダルナビルは免疫担当細胞内で薬効を発現し、その細胞内濃度はP糖蛋白質により制御されているが、臨床では併用されているリトナビルによりP蛋白質が阻害されており、細胞内からの排泄が遅延して血漿中濃度の変動を必ずしも反映していないことが明らかになった。ガドキセト酸は複数の幾何異性体の混合物であり、細胞内からの排泄に関する能動輸送担体が異性体間で異なることが明らかとなり、能動輸送担体の機能により造影効率に差が現れることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To establish a method of dosage adjustment for darunavir (DRV) based on pharmacokinetic theory, we analyzed the correlation between DRV levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and plasma. An in vitro kinetic study using MOLT-4 cells was performed to assess the contribution of RTV to the intracellular accumulation of DRV. We found a poor correlation between intracellular DRV and plasma DRV levels in patients receiving HAART. The efflux rate of DRV from cells was slow; therefore, the concentration of DRV in PBMCs may reflect average exposure to the drug and clinical efficacy. The contribution of carrier-mediated transport systems on the biliary elimination of gadoxetate was examined. The geometrical isomer with specific conformation corresponding to 22.6% of gadoxetate was eliminated into bile in rats via a carrier-mediated transport system no later than 30min after intravenous injection.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：薬剤抵抗性 薬動力学 細胞内薬物濃度

1. 研究開始当初の背景

薬物に対する反応には個人差があり、常用量では期待する効果が得られない、あるいは有害な反応が現れる患者が存在することは、薬物療法上の重要な問題であった。薬効の個人差の多くが薬物体内動態の個人差に起因するため、血液中薬物濃度に基づいて個々の患者の投与量を調節する Therapeutic Drug Monitoring (TDM)の有用性が明らかとなり、我が国では1980年に特定薬剤治療管理料の算定が認められた。研究代表者は、長年にわたってTDMの前提となる生体試料中の薬物測定法の開発やTDM実施時における臨床上の諸問題に取り組んできた。近年の数値解析技術や分子生物学の発達により、薬物体内動態の個人差が様々な遺伝的因子や薬物間相互作用により引き起こされることが明らかになった。研究代表者も多くの薬物で遺伝的因子や薬物間相互作用が薬物動態に及ぼす影響を解析し、血中濃度変化の予測を試みてきた。薬物代謝酵素阻害による他薬物の血中濃度上昇の予測が可能となり、代謝酵素の誘導による血中濃度の低下についても方法論が確立されつつある。さらに、近年では肝臓や腎臓などの薬物処理臓器への取り込みに関与するトランスポータの阻害による影響が着目され、活発に研究が進展している。副作用の多くは必ずしも標的臓器で起こるとは限らないため、臓器非特異的な血中薬物濃度の上昇は極めて有用な指標となりうる。

一方で、薬効の変化には血中薬物濃度の変化では説明できないものも存在し、研究代表者らはアザチオプリンやワルファリンなどにおいて、血中濃度の変動を伴わない薬効の変動があること示し、特にアザチオプリンにおいては標的細胞内の活性代謝物の蓄積が薬効や副作用の発現に重要な役割を果たしており、我が国で行われる低用量療法においては治療抵抗性の原因となることを明らか

にした。薬効の指標には標的組織内の薬物濃度が適しているが、ヒトで組織検体を得ることが極めて困難であることから、これまで十分な検討は進んでいないのが現状である。近年、PETなどのイメージング技術を用いた組織内薬物動態が試みられており、生理学的薬力学解析への応用が期待されている。また、質量分析技術の向上により、ヒトで毒性を引き起こす危険性が少ない超低用量を投与し、ヒトでの薬物動態研究の危険性を低減する努力が進められている。逆に、常用量を投与されている患者であれば超微量の検体でも薬物濃度測定が可能であり、血液以外の検体がTDMの対象になりうるという着想に至った。さらに、細胞機能の分子生物学的理解が急激に進んでおり、標的組織を検体とすることで薬効あるいは毒性発現の個体差の因子を分子レベルで解明し得ると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内の薬物濃度が重要な薬物として、白血球細胞内で抗ウイルス活性を示す抗 HIV 薬、細胞内に取り込まれることにより造影効果を示す MRI 用造影薬、細胞増殖を制御する情報伝達系に作用するチロシンキナーゼ阻害薬を取り上げ、その細胞内薬物濃度を制御する因子を明らかにするとともに、薬効決定因子として血中濃度と細胞中濃度の寄与を比較する。抗 HIV 薬ダルナビルは既に蛍光検出 HPLC で白血球中濃度を測定することができるが、多剤併用時の相互作用解析なども考慮して LC-MS/MS による高感度定量法を確立する。既に併用薬剤による P 糖タンパク阻害がダルナビルの白血球中濃度 / 血中濃度比に影響を与えることを示唆するデータを得ており、今後は併用抗 HIV 薬が白血球に発現している各種薬物排出トランスポータに及ぼす作用を *in vitro* および *in vivo* 試験で評価する。さらに、HIV 感染患者を対象とする臨床試験において血

中濃度および白血球中濃度と血中ウイルス量変化の薬力学的解析に基づいて、併用薬や各種トランスポータの遺伝子型の影響を定量的に評価する。ガドキセト酸は肝臓に特異的に集積する MRI 用造影剤であるが、OATP により能動的に取り込まれることにより、OATP を発現していない腫瘍組織の検出に優れている。我々はガドキセト酸が OATP に対する基質特異性が異なる複数の立体異性体の混合物であることを示した。ガドキセト酸を用いた造影による肝腫瘍検出力は各異性体の血中濃度と肝組織中濃度に依存するので、それぞれの決定因子を明らかにすることが必要になる。そこでガドキセト酸のそれぞれの立体異性体を分離して、各種トランスポータに対する基質特異性を *in vitro* 試験により比較する。さらに、臨床試験で得られた造影画像から肝への集積率を推定し、各種トランスポータの遺伝子型の違いによる影響を評価する。

3. 研究の方法

臨床検体

ダルナビルで治療を受けており、少なくとも 6 カ月間治療が安定している HIV 感染者 19 名を被験者とした。検査結果および治療歴は診療情報から得た。DRV の最終投与から 24 ± 3 時間後に各患者から 8 mL の血液を採取し、19 名の患者から 33 検体を採取した（各患者から 1 または 2 ポイント）。密度勾配遠心分離法により PBMC および血漿を採取するための採血管として、BD Vacutainer 単核細胞調製管を用いた。血液サンプルを $2,600 \times g$ で 20 分間遠心分離し、血液採取から 2 時間以内に PBMC および血漿層を分離した。PBMC 試料を氷冷リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 10 mL で 2 回洗浄し、 1.0×10^6 細胞/mL の濃度になるように PBS に懸濁した。血漿および PBMC 試料をポリエチレンチューブに分注し、直ちにアッセイするか、

またはアッセイまで暗条件下で -25°C で保存した。

細胞内薬物動態の検討

ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株である MOLT-4 を、10% FCS および 1% ペニシリン/ストレプトマイシン溶液を含む RPMI-1640 培地で培養し、5% CO_2 の存在下で 37°C でインキュベートした。細胞を 3~4 日ごとに継代し、継代 15~20 をアッセイに使用した。アッセイ前に FBS を含まない RPMI-1640 培地で細胞を 24 時間培養した。MOLT-4 細胞を、 1.0×10^6 細胞/ウェルで 24 ウェルプレートに播種し、 37°C 、5% CO_2 の存在下で DRV または DRV および RTV (DRV: 0.05-10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、RTV: 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む RPMI-1640 培地で培養した。24 時間のインキュベーション後、細胞を集め、1 mL の氷冷 PBS で 2 回洗浄し、200 μL の PBS に懸濁した。懸濁した細胞をポリエチレンチューブに分注し、直ちにアッセイするか、または DRV の細胞内濃度を検出するアッセイまで暗条件下で -25°C で保存した。

MOLT-4 細胞を、 1.0×10^6 細胞/ウェルで 24 ウェルプレートに播種し、5% CO_2 の存在下で DRV または DRV および RTV (DRV: 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、RTV: 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む RPMI-1640 培地で 37°C で培養した。12 時間のインキュベーション後、細胞を 1 mL の氷冷した PBS で 2 回洗浄し、5% CO_2 の存在下、 37°C で DRV を排除する培地中でインキュベートした。細胞を 0, 1, 3, 6, 9, 12 時間で収集し、1 mL の凍結 PBS で 2 回洗浄した後、200 μL の PBS に懸濁させた。懸濁した細胞をポリエチレンチューブに分注し、直ちにアッセイするか、または DRV の細胞内濃度を検出するアッセイまで暗条件下で -25°C で保存した。

ガドキセト酸の肝細胞内動態の検討

ガドキセト酸をラットに静脈内注射し、各

異性体の血中濃度および胆汁排泄の推移を検討した。

4. 研究成果

抗 HIV 薬であるダルナビルは免疫担当細胞内で薬効を発現し、膜表面に発現した P 糖蛋白質により能動的に排泄されている。MRI 造影剤であるガドキセト酸は肝細胞内に集積するが、その細胞内取込も能動的輸送体の関与が知られている。本研究ではこれらの薬剤の細胞内動態と薬効の関係を明らかにする目的で、細胞内薬物濃度測定のための超微量定量法を開発し、薬物の細胞内動態を解析した。ダルナビルの細胞内濃度は P 糖蛋白質により制御されているが、臨床では併用されているリトナビルにより P 蛋白質が阻害されており、細胞内からの排泄が遅延して血漿中濃度の変動を必ずしも反映していないことが明らかになった。ガドキセト酸は複数の幾何異性体の混合物であり、細胞内からの排泄に関与する能動輸送担体が異性体間で異なることが明らかとなり、能動輸送担体の機能により造影効率に差が現れることが示唆された。

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 1 件)

Daisuke Nagano, Takuya Araki, Kunio Yanagisawa, Yoshiyuki Ogawa, Fumito Gohda, Hideki Uchiumi, Hiroshi Handa, Tomonori Nakamura, Koujiro Yamamoto: Darunavir concentration in PBMCs may be a better indicator of drug exposure in HIV patients. Eur J Clin Pharmacol, in press. (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

Daisuke Nagano, Takuya Araki, Kunio Yanagisawa, Yoshiyuki Ogawa, Hideki Uchiumi, Yoshihisa Nojima, Koujiro Yamamoto: The influence of the genetic polymorphisms of efflux transporter on DRV levels in PBMC and plasma. American Society of Clinical Pharmacology and

Therapeutics Annual Meeting 2017. March 16, 2017. Washington D.C., USA. (Poster)

Daisuke Nagano, Takuya Araki, Kunio Yanagisawa, Yoshiyuki Ogawa, Hideki Uchiumi, Koujiro Yamamoto: The influence of the genetic polymorphisms of efflux transporter on DRV levels in PBMC and plasma. The 13th Congress of the European association for clinical pharmacology and therapeutics (EACPT). June 25, 2017. Prague, Czech Republic. (e-Poster)

Junji Ogawa, Azusa Yokota, Takuya Araki, Tohru Aomori, Tomonori Nakamura, Ichiro Koshiichi, Koujiro Yamamoto: Difference of biliary elimination of gadoxetate between geometrical isomers in rat. 第 10 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム. 前橋. 2016 年 11 月 6 日 (ポスター発表)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 康次郎 (Yamamoto, Koujiro)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 70174787

(2) 研究分担者

荒木 拓也 (Araki, Takuya)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 00568248

坂下 真大 (Hashita, Tadahiro)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号: 20613384

永野 大輔 (Nagano, Daisuke)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 90738387