

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08091

研究課題名(和文) 循環動態異常を伴う先天性心疾患患児の薬物動態変動機構解明と治療最適化への展開

研究課題名(英文) Mechanisms of the pharmacokinetic variability and optimization of drug therapy in children with congenital heart disease

研究代表者

田口 雅登 (Taguchi, Masato)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授

研究者番号：20324056

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)：心疾患患児における薬物体内動態に関する文献情報は非常に限られている。我々は小児循環器患者におけるワルファリンの抗凝固作用推定モデルの構築においてアロメトリー式に基づく仮想的な body size (SIZE) の導入が有用であることを示すとともに、VKORC1のジェノタイプとボセンタン併用によって抗凝固作用が変動する事を明らかにした。また、蛋白漏出性胃腸症の発症を契機としてタダラフィルの非結合型分率(fu)が長期的に上昇傾向にある事を見出した。さらに関連するin vitro基礎実験によって薬物動態変動機構の裏づけとなる基礎的な知見を得る事ができた。

研究成果の概要(英文)：There has been a limited number of reports documenting the pharmacokinetics of drugs in children with congenital heart disease. We demonstrated that the SIZE parameter appeared to be an effective way to describe the pediatric dose response relationship of warfarin, and that the anti coagulant effect of the drug was changed by the VKORC1 genotype and concomitant use of bosentan. We also found that the unbound fraction of tadalafil was tend to increase in the patients with protein-losing enteropathy. These efforts could provide an important basis for the proper use of drugs in children with heart disease.

研究分野：医療薬学

キーワード：ワルファリン タダラフィル 先天性心疾患 薬物体内動態 小児

1. 研究開始当初の背景

薬物療法の安全性を確保しつつ有効性を引き出すためには、薬物動態特性と個体間変動機構を明らかにし、患者毎に薬物投与の最適化を図る必要がある。しかし、頻回の血中濃度測定に基づく薬物速度論解析は、患者に多大な採血負担を強いるため、治療上のメリットが少なく倫理面でも問題がある。これまでに申請者は、一人あたりの採血を2回とする臨床試験デザインとデータ解析法を考案するとともに、この方法論を小児・高齢者を対象とする臨床薬物動態研究へ応用し、循環器器官用薬の体内動態変動性評価に取り組んできた。その結果、小児・新生児は成人よりも薬物動態の個体差が顕著であったことから、特に治療の最適化(個別化)が必要な患者集団と考えられた。一方、先天性心疾患(複雑奇形)を有する新生児・小児の一部では、血中濃度の異常値が観察される場合があるが、従来の PPK 解析法ではこうした患者はアウトライヤーとして除外され、学術の対象となり難い問題がある。しかし、異常な薬物動態が観察される患者集団こそ薬物投与の最適(標準)化が必要であるとも考えられる。すなわち、小児心疾患の複雑多様性を鑑みれば、個々の症例における薬物動態の実態と体内動態変動機構の解明を目指す探索的研究が小児医療の安全性確保の観点からも緊要性が高い課題と考えられた。小児循環器患者の中には心臓生理と心血管構造の先天異常を合併した病態が含まれることから、我々は心疾患症例において使用される薬物に関して体内動態特性の評価を行うとともに、薬物動態(或いは薬効)変動機構の解明を図る必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、現在小児循環器領域で汎用される2つの薬剤に着目し、基礎と臨床の観点から薬物動態特性の評価を行い、薬物動態変動機構解明に繋がる基礎的根拠を得る事を目的とした。具体的には、抗凝固薬ワルファリン、5型ホスホジエステラーゼ阻害剤タダラフィルを服用中の小児・新生児を対象とした臨床試験を企画・実施し、薬効や薬物動態変動を来す共変量を探索的に解析した。また我々は、得られた医薬品情報を速やかに医療現場へ還元する一方、臨床薬物動態特性と個体間変動機構の裏づけとなる基礎的知見を得るため、各種培養細胞株やヒト肝ミクロソーム等を用いた基礎研究を実施した。

3. 研究の方法

主に以下の(1)~(5)の研究を行った。
 (1)ワルファリン抗凝固作用の共変量に関する解析: 抗凝固薬ワルファリンの小児期における維持投与量(mg/kg/day)には大きな個体間変動および個体内変動が観察される。これまでに我々は、体重補正したワルファリン一日投与量(DD/WT)、ビタミンKエポ

キシド還元酵素複合体1(VKORC1)の遺伝子変異(1173 T>C)および患児の年齢(Age)を共変量とするワルファリンの抗凝固作用(プロトロンビン時間国際標準比;PT-INR)推定モデルを報告した。一方、小児発達の個体差は大きく、共変量に年齢を用いると患児個々の発達の影響を過大/過小評価する場合があった。そこで本研究では、発達の影響に対してより頑健なモデルを得る目的で、体重をアロメトリー式に基づく仮想的な body size(SIZE)に置き換えるとともに、長期データの収集・解析によって共変量の再評価を試みた。少なくとも3年以上にわたりワルファリンを服用した小児循環器患者23名を対象とした。PT-INR値の急変動時は調査対象外とし、2週間以上同一用法・用量で維持された際のPT-INRを実測値として収集した。データ解析には、NONMEMプログラムを用いた。
 (2)P-糖タンパク質発現細胞を用いたタダラフィルの輸送特性評価: PDE-5阻害剤であるTadalafil(TAD)とSildenafil(SIL)は肺高血圧症の治療薬として広く使用される。半減期の短いSILは心臓手術後の肺高血圧症に使われ、長期管理へ移行する際にTADへ切り替えられる。これまでに、小児患者におけるSIL及びTADの体内動態には大きな個体差が観察されることが報告されている。一方、近年SILの体内動態にP-糖タンパク質(P-gp)の関与を示唆する報告がなされたが、TADがP-gpの基質であるか否かは不明である。そこで本研究では、P-gpを介したTADの輸送特性を明らかにする目的で、invitro 経細胞輸送実験を行った。すなわち、腎上皮由来細胞株LLC-PK1およびそのP-gp発現株LLC-GA5-COL150を実験モデルとして使用した。SILとTADの経細胞輸送活性の比較にあたって、LLC-GA5-COL150における薬物輸送の速度論パラメータを算出した。また、選択的P-gp阻害剤(PSC833)による阻害実験を追加した。
 (3)カルベジロール代謝に及ぼすアミオダロンの影響: 遮断薬カルベジロール(CRV)の主代謝経路はUDP-グルクロン酸転移酵素(UGT)による直接抱合反応である。これまでに我々は、プールド・ヒト肝ミクロソーム(HLM)によるラセミ体CRVのグルクロン酸抱合(Glu)反応がアミオダロン(AMD)共存下でR体選択的に亢進する現象を見出した。一方近年、CRVのGlu反応においてエナンチオマーが相互に影響を及ぼす事が報告された。そこで本研究では、AMDによる立体選択的な反応亢進機構を明らかにする目的で、光学異性体がない実験条件でGlu活性の変動を解析した。より具体的には、市販のHLMを用いてS体またはR体のGlu代謝物の生成活性を評価した。本反応系はウシ血清アルブミン(BSA)を0.2%含むことから、AMDによるCRVの蛋白結合率の変動を限外濾過法により評価した。
 (4)P-糖タンパク質を介したタクロリムスの経細胞輸送に及ぼすリスペリドンの影響: 近年我々は、非血縁者間同種造血幹細胞移植

患者において、ポリコナゾール(VRCZ)とリスペリドン(RSP)の併用が一因と考えられるタクロリムス(TAC)血中濃度の著しい上昇を経験した。既報の母集団パラメータに基づくベイジアン解析によってこの患者の体内動態パラメータを概算したところ、クリアランスCLの低下とバイオアベイラビリティ(F)の上昇が示唆された。そこで我々は、VRCZによる肝臓と小腸のCYP3A阻害と、RSPによる小腸のP-gp阻害が相乗的な影響を及ぼしたという仮説を立てた。本研究では、P-gpを介したTACの輸送に及ぼすRSPの影響を明らかにする目的で培養細胞株(Caco-2およびLLC-GA5-COL150)におけるP-gp基質の経細胞輸送に及ぼすRSPとその代謝物の影響を評価した。

(5) 蛋白漏出性胃腸症患児におけるタダラフィルの体内動態変動とヒト血清由来蛋白質に対する薬物結合特性評価：蛋白漏出性胃腸症(PLE)は、先天性心疾患に対するFontan手術やGlenn手術を受けた患者に発症する予後不良の合併症である。PLEの病態はアルブミン(Alb)などの蛋白を含むリンパ液の腸管内への漏出であり、PLE患者では低タンパク血症を呈する。一方、肺血管拡張薬のタダラフィル(TAD)は先天性心疾患に伴う肺高血圧症に対し長期投与されるが、PLE患者における体内動態変動は不明である。近年我々はTADの血漿蛋白結合率に大きな個体間変動がある事を報告しており(Ther Drug Monit, 36:576-83, 2014)、頭痛や顔面紅潮、背部痛等のTAD投与に伴う副作用との関連性に着目している。本研究では、PLE患者におけるTADの体内動態変動の実態を明らかにする目的で、TADを長期服用中の小児患者で本研究への参加同意が得られた2症例における血漿中非結合型分率(fu)の経日変動を評価した。本研究では患者負担を考慮し、血液サンプルは診療目的で行われた生化学的検査後の残血清を用いた。また、TADの蛋白結合に関する基礎情報を得る目的でヒト血清Albを用いたin vitro結合アッセイを行った。

4. 研究成果

(1) ワルファリン抗凝固作用の共変量に関する解析：年齢、体重の平均値はそれぞれ8.49歳、24.5kgであった。平均追跡期間は7.36年であり、解析に用いたデータ数は857ポイントであった。個々の患者のDD/SIZEとPT-INRの関係について回帰式を得た。すなわち、VKORC1が1173CTまたはCCジェノタイプである患者(n=6)の薬効は、1173TTジェノタイプである患者(n=14)の47.3%と算出された。さらに、ボセンタン併用時の抗凝固作用は、非併用時の84.1%に低下すると算出された。以上の結果から、ワルファリンの抗凝固効果に及ぼす発達の影響がSIZEで記述可能であること、および長期データの解析によって個体間変動のみならず個体内変動の共変量が検出可能であることが明らかとなっ

た。

(2) P-糖タンパク質発現細胞を用いたタダラフィルの輸送特性評価：LLC-GA5-COL150ではSIL(5 μ M)のbasolateral側からapical側(B \rightarrow A)への120分間の輸送活性が反対方向(A \rightarrow B)の1.52倍であり、LLC-PK1の場合(0.711倍)と比べて有意に大きかった。同様に、LLC-GA5-COL150ではTAD(5 μ M)のB \rightarrow A方向の120分間の輸送活性がA \rightarrow B方向の10.4倍であり、LLC-PK1の場合(1.23倍)と比べて有意に大きかった。LLC-GA5-COL150におけるSIL輸送のVmaxおよびKm値は、それぞれ101 \pm 64 pmol/min/cm²、112 \pm 47 μ Mであった。同様に、LLC-GA5-COL150におけるTAD輸送のVmaxおよびKm値は、それぞれ13.6 \pm 4.8 pmol/min/cm²、22.7 \pm 9.3 μ Mであった。PSC833(2 μ M)の存在下では、LLC-GA5-COL150におけるTADのB \rightarrow A方向の30分間の輸送量が28.6%減少し、A \rightarrow B方向の輸送量が6.59倍に増加した。本研究の結果から、TADはSILよりもP-gpに対する親和性の高い基質であることが明らかとなり、TADの体内動態変動メカニズムにP-gpが関与する可能性が考えられた。

(3) カルベジロール代謝に及ぼすアミオダロンの影響：AMD非共存下におけるGlu活性は、S体およびR体(30 μ M)でそれぞれ0.487、0.027(pmol/min/mg protein)であり、AMDの添加(50 μ M)によってそれぞれ1.60および6.15倍に上昇した。しかし、BSA非存在下、或いはBSAをヒト血清アルブミンに置換した場合、AMDによるGlu活性亢進が観察されなかったことから、BSAがGlu反応の亢進に関与すると考えられた。反応系におけるCRVの遊離型濃度は、AMD非共存下ではS体優位であったのに対し、AMD共存下ではS体とR体でほぼ同等であったことから、AMDがCRVの蛋白結合率を変動させたことが明らかとなった。AMDによってR体選択的にGlu反応が亢進したのは、BSAに対するCRVの特異的な蛋白結合がS体よりもR体で大きく変動したためであることが明らかとなった。

(4) P-糖タンパク質を介したタクロリムスの経細胞輸送に及ぼすリスペリドンの影響：Caco-2細胞ではRhodamine123(5 μ M)のapical(A)側からbasolateral(B)側への輸送(A \rightarrow B)がRSP(100 μ M)存在下で47.1%上昇し、B \rightarrow Aが61.7%低下した。一方、P-gpを強発現させたLLC-GA5-COL150細胞では、TAC(5 μ M)のA \rightarrow BがRSP(100 μ M)によって30.5%上昇した。また、RSPの代謝物であるパリペリドン(100 μ M)によってもA \rightarrow Bが26.1%上昇した。RSPとその代謝物の影響は、P-gpの選択的阻害剤であるPSC833(2 μ M)の阻害効果(33.1%)と同程度であったことから、RSP併用が小腸のP-gpを介したTAC排出を阻害し得ることが明らかになった。我々の臨床知見では、VRCZ併用によるFの上昇がRSP併用時に特に著明であった。本研究の結果は、上述した我々の仮説を支持するものと考えられた。

(5) 蛋白漏出性胃腸症患児におけるタダラフィルの体内動態変動とヒト血清由来蛋白質に対する薬物結合特性評価: 症例1では入院期間中、PLEの再燃毎に血清Alb値の変動が認められたのに対し、症例2では血清Alb値が症例1に比べて安定的に推移した。すなわち、症例1における血清Alb値は2.4~4.2 g/dlの範囲で変動し、TADのfu(3.9~13.0%)がAlb低下時に上昇する傾向が観察された。一方、症例2の血清Alb値の変動は2.9~3.5 g/dlと比較的小さく、fuは5.0~7.0%と安定していた。但し、症例2が3歳時点における過去データと比較した場合、血清Albとfuの値がそれぞれ4.5 g/dl、3.3%であったことから、PLEの発症前後でTADのfuが顕著に異なる事が明らかとなった。また、ヒトAlb濃度の低下(5.0~1.0 g/dl)に伴いfuが上昇する現象はin vitroにおけるTADの結合アッセイでも確認できたことから、AlbはTADの重要な結合キャリアと考えられた。本研究の結果、PLE患者ではTADのfuが上昇傾向にあるため、TADのみならず血漿蛋白結合率が高い薬剤の治療モニタリングにあたっては遊離型濃度の測定が必要である事が示唆された。一方、今回のfuの評価にあたっては、残血清を使用したため採血時間が一定でない事に加え、アルブミン以外のタンパク質の影響が交絡した可能性を排除しきれない。In vitroの蛋白結合アッセイの追加試験によってTADが-1酸性糖蛋白質とリポタンパク質にも結合する事が明らかとなった。(投稿準備中)

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4件)

Watanabe N, Higashi H, Nakamura S, Nomura K, Adachi Y, Taguchi M: The possible clinical impact of risperidone on P-glycoprotein-mediated transport of tacrolimus: A case report and in vitro study. *Biopharm Drug Dispos*, 39, 30-7(2018).

Higashi H, Watanabe N, Tamura R, and Taguchi M: In Vitro P-Glycoprotein-Mediated Transport of Tadalafil: A Comparison with Sildenafil. *Biol Pharm Bull*, 40, 1314-9(2017).

Sekimoto M, Takamori T, Nakamura S, and Taguchi M: In Vitro Enhancement of Carvedilol Glucuronidation by Amiodarone-Mediated Altered Protein Binding in Incubation Mixture of Human Liver Microsomes with Bovine Serum Albumin. *Biol Pharm Bull*, 39, 1359-63(2016).

Nakamura S, Watanabe N, Yoshimura N, Ozawa S, Hirono K, Ichida F, and Taguchi

M: A model analysis for dose-response relationship of warfarin in Japanese children: An introduction of the SIZE parameter. *Drug Metab Pharmacokinet*, 31, 234-41(2016).

[学会発表](計6件)

高森 徹、重富七海、神谷健太、青木正哉、芳村直樹、小澤綾佳、斉藤和由、廣野恵一、市田路子、田口雅登。蛋白漏出性胃腸症患者におけるタダラフィルの血漿蛋白結合率変動。第34回日本TDM学会・学術総会2017, Sep 23-24; 京都。

東宏伎、渡辺直、田村理香、田口雅登。P-gp発現細胞株におけるタダラフィルの経細胞輸送~シルデナフィルとの比較, 日本薬学会第137年会, 2017, Mar 24-27; 仙台。

田口雅登, 渡辺 直, 東 宏伎, 中村早稀, 野村恵子, 足立雄一。タクロリムスの消化管吸収に及ぼすリスペリドンの影響, 日本臨床薬理学会第136年会, 2016, Dec 1-3; 米子。

渡辺 直, 東 宏伎, 中村早稀, 野村恵子, 足立雄一、田口雅登。P-糖タンパク質を介したタクロリムスの経細胞輸送に及ぼすリスペリドンの影響, 日本薬学会第136年会, 2016, Mar 26-29; 横浜。

関本 真、高森 徹、勝眞愛梨沙、中村早稀、田口雅登。肝ミクロソームを用いたカルベジロールのグルクロン酸抱合反応系に及ぼすアミオダロンの影響, 日本薬学会第136年会, 2016, Mar 26-29; 横浜。

田口雅登、中村早稀、渡辺 直、芳村直樹、小澤綾佳、廣野恵一、市田路子。小児期におけるワルファリン抗凝固作用の共変量に関する長期データ解析。第42回日本小児臨床薬理学会学術集会, 2015, Nov 14-15; 熊本。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田口 雅登 (TAGUCHI, MASATO)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授

研究者番号: 20324056

(2) 研究分担者

市田 路子 (ICHIDA, FUKIKO)

富山大学・事務局・学長補佐

研究者番号: 30223100

廣野 恵一 (HIRONO, KEIICHI)

富山大学・附属病院・助教

研究者番号: 80456384

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし