

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2021

課題番号：16K18935

研究課題名(和文)細胞内分子薬理に基づく新規尿酸生成抑制薬とプリンアナログの至適併用の確立

研究課題名(英文) Establishment of optimal combination of novel inhibitors of uric acid production and purine analogs based on intracellular molecular pharmacology

研究代表者

森田 美穂子 (Morita, Mihoko)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：40623872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：培養がん細胞を用いて尿酸生成抑制薬Febuxostat (FEB)とプリンアナログ6MPの細胞増殖抑制効果を確認した。FEBと6MPの薬物相互作用をCombination Indexを用いて算出し、CI値0.114と明らかな相乗作用が認められた。本実験により、24時間でのFEBの強力な経時的XOD阻害作用を確認できた。6MP併用条件下でXOD活性を確認し、6MPそのものはXOD活性に影響を与えないことが示唆された。生細胞数のカウントによりFEBは細胞毒性を認めず、6MPとFEB併用により6MPの細胞毒性の増強が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高尿酸血症治療薬であるxanthine oxidase (XOD) 阻害薬はプリン代謝を阻害することで尿酸生成を抑制する。そのためアロプリノールとプリンアナログとの併用時には、減量規定に基づきプリンアナログの投与量を調節する。しかし、2011年に本邦にて上市されたフェブキソスタットとプリンアナログとの併用についてはその至適減量基準は確立されていなかった。本研究では、フェブキソスタットと代表的プリンアナログ、6メルカプトプリン(6-MP)との相互作用について、培養白血病細胞を用いて分子薬理的に検討し、相乗効果を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The cell proliferation inhibitory effect of Febuxostat (FEB), an inhibitor of uric acid production, and 6MP, a purine analog in combination, was confirmed in leukemia cells. The CI value was 0.114, showed a clear synergistic effect. This study showed the strong temporal XOD inhibitory effect of FEB at 24 h. XOD activity was confirmed under the 6MP combination condition, suggesting that 6MP itself has no effect on XOD activity. Cell viability experiments showed that FEB was not cytotoxic, suggesting that the combination of 6MP and FEB enhanced the cytotoxicity of 6MP. There are interactions when these drugs are used in combination, and caution should be exercised.

研究分野：血液・腫瘍内科 腫瘍崩壊症候群 痛風

キーワード：薬物相互作用 XOD阻害薬 XOD活性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高尿酸血症治療薬である xanthine oxidase (XOD) 阻害薬はプリン代謝を阻害することで尿酸生成を抑制する。そのため Allourinol とプリンアナログとの併用時には、減量規定に基づきプリンアナログの投与量を調節する。しかし、2011 年に本邦にて上市された XOD 阻害薬 febuxostat とプリンアナログとの併用については検討されておらず、その至適減量基準は確立されていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、新規 XOD 阻害薬と代表的プリンアナログ、6-メルカプトプリン(6MP)との相互作用について、培養がん細胞を用いて分子薬理的に解明し、6MP の減量基準を決定する分子マーカーを同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞増殖抑制効果

培養白血病細胞 (CEM) における細胞増殖抑制効果を XTT assay にて検討した。XTT assay は Rosche 製品にて行い、72 時間培養ののち、手順書に従い測定した。IC<sub>50</sub> 値は増殖抑制カーブより求めた。

#### (2) 薬物相互作用

薬物相互作用は Combination Index(CI)より測定した。CI 法は Chou and Talalay (Adv Enz Regul 1984;22:27-55.)の報告に基づいて行い、その測定値は CalcuSyn (version 2.0) (Biosoft, Great Shelford, Cambridge, UK)によって算出した。CI<1 は相乗作用、CI=1 は相加作用、CI>1 は拮抗作用と判断した。

#### (3) XOD 活性の測定

XOD 活性測定のために、24 時間培養後に xanthine oxidase fluorometric assay を Cayman chemical のキットを用いて手順に沿って施行した。excitation 波長は 535 nm、emission 波長は 590 nm に設定した。

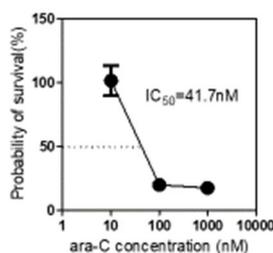
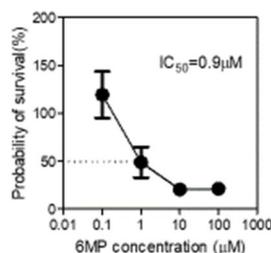
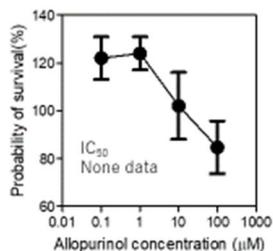
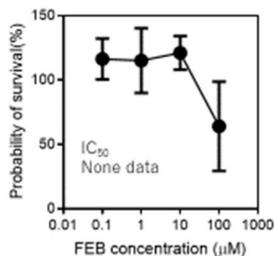
#### (4) cell viability の評価

24 時間培養後、生細胞はトリパンブルー染色に不染であることを用いてトリパンブルー染色後にカウントした。

### 4. 研究成果

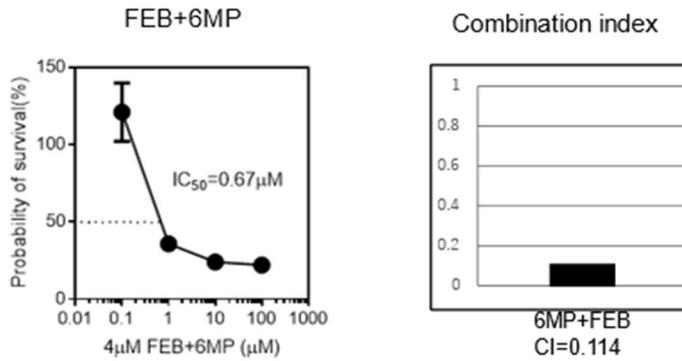
#### (1) 細胞増殖抑制効果

Febuxostat と allopurinol はいずれも IC<sub>50</sub> に到達せず、6MP の IC<sub>50</sub> は 0.9  $\mu$ M、対照薬シタラビン(araC)の IC<sub>50</sub> は 41.7 nM であった。



## (2) 薬物相互作用

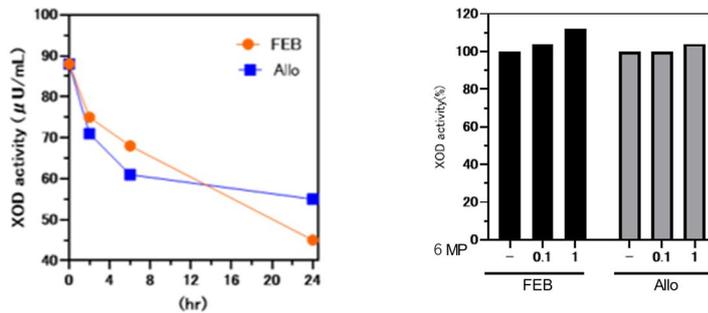
Febuxostat と 6MP においては、CI 値 0.114 と明らかな相乗作用が認められた。一方、araC 単独の IC<sub>50</sub> は 41.7 μM、Febuxostat と araC の併用における IC<sub>50</sub> は 43.7 μM、Febuxostat と allopurinol の併用における IC<sub>50</sub> は 45.7 μM であり、相乗効果は認められなかった。



## (3) XOD 活性の測定

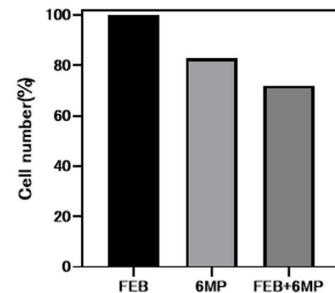
XOD 活性は febuxostat 投与条件下において 2 時間値 74.7 μU/ml、6 時間値 67.8 μU/ml そして 24 時間値 45.8 μU/ml であった。allopurinol 投与下における XOD 活性は 2 時間値 71.0 μU/ml、6 時間値 60.8 μU/ml そして 24 時間値 55.0 μU/ml であった。これらより 6 時間値において Allopurinol が Febuxostat に比して強力な XOD 阻害を呈していた。Allopurinol 代謝により Allopurinol と同様に XOD 阻害作用を有する oxypurinol が産生されるため、その oxypurinol の関与の影響であると考えられた。24 時間値においては、febuxostat の方がより強力な XOD 阻害作用を呈していることが確認された。

ついで、6MP 併用条件における febuxostat と allopurinol の XOD 活性を同様の手順にて確認した。6MP そのものは XOD 活性に影響を与えないことが示唆された。



## (4) cell viability

febuxostat は細胞毒性を認めず、6MP は細胞生存率を低下させ、febuxostat 併用によってさらに生細胞の低下が認められた。これは、febuxostat が 6MP の細胞毒性を増強したことを示唆していると考えられた。



## (まとめ)

培養がん細胞において 72 時間での細胞増殖抑制効果から 6MP と Febuxostat の併用療法において明らかな相乗効果を示した。

XOD 活性は、Febuxostat または Allopurinol によって時間とともに減少し、Febuxostat は 24 時間で Allopurinol よりも強力な XOD 阻害効果を示していた。

データは、相乗効果が 2 つの薬剤間の細胞内機構的相互作用によって得られたことを示唆している。

これらにより臨床的には、Febuxostat と 6MP の併用において、細胞障害作用が増強するため、Allopurinol と 6MP の併用時のように減量の必要があることを示唆している。至適用量の確立にまで至らなかったことは本研究の限界であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Morita Mihoko, Rie Nishi, Takahiro Yamauchi, Takanori Ueda
2. 発表標題 How the combination of 6-mercaptopurine with febuxostat affects xanthine oxidase activity in vitro
3. 学会等名 The 18th Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田美穂子、山内高弘
2. 発表標題 悪性リンパ腫における高尿酸血症と腫瘍崩壊症候群の現状について
3. 学会等名 日本痛風・尿酸核酸学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田美穂子
2. 発表標題 血液内科医と尿酸
3. 学会等名 第3回日本痛風・尿酸核酸学会若手委員会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田美穂子, 大岩加奈, 藤田 慧, 大蔵美幸, 松田安史, 根来英樹, 田居克規, 細野奈穂子, 上田孝典, 山内高弘
2. 発表標題 非ホジキンリンパ腫における腫瘍崩壊症候群に対する高用量フェブキソスタットの有効性
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------