

令和元年5月8日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18955

研究課題名(和文) CYP3A5遺伝情報に基づくC型肝炎治療薬の適正使用を目指した薬理遺伝学的研究

研究課題名(英文) Pharmacogenetic study on anti-hepatitis C drugs based on CYP3A5 polymorphisms

研究代表者

松本 准 (Matsumoto, Jun)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60709012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：C型肝炎は、C型肝炎ウイルスが感染することで発症するウイルス性肝炎である。近年、C型肝炎治療薬の発展は目覚ましく、次々と新しい薬物が開発されている。一方で、これらの薬物の薬価は極めて高く、各患者に最適な治療薬を選択することが重要である。本研究では、各個人における薬物代謝酵素CYP3A5の遺伝子配列の相違に着目し、一部の新規C型肝炎治療薬においてはCYP3A5遺伝情報がその効果を規定できる可能性を有していることを初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、多くの新規C型肝炎治療薬が上市されたが、それらの効果の個人差を規定することができる明確な因子は特定されていない。本研究の成果により、CYP3A5遺伝情報が一部の新規C型肝炎治療薬の個人差を規定できる要因となり得ることが初めて明らかになった。また、本研究では対象としなかった他のC型肝炎治療薬についてもCYP3A5遺伝情報が有用である可能性もあり、今後CYP3A5遺伝子型に基づいて各患者の薬物治療の個別適正化が図れる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Hepatitis C is a liver disease that is caused by blood-borne viral infection. Several direct-acting antiviral agents (DAAs) have been developed to treat Hepatitis C, which have sustained virological response rates against HCV genotypes 1a and 1b over 90 percent. It is desirable to select the best DAA regimen for each case, as the costs of DAAs are usually high, and treatment failure by a DAA regimen may promote drug-resistant strains. In this study, we have focused on cytochrome P450 (CYP) 3A5 and have investigated the impact of CYP3A5 polymorphisms on four DAAs, asunaprevir, daclatasvir, beclabuvir, and paritaprevir metabolism. Our results have shown that the CYP3A5 has an important role in asunaprevir metabolism, but not in daclatasvir, beclabuvir, and paritaprevir metabolism. The findings of the present study may provide foundational information on DAAs metabolism by CYP3As, and may be useful for dosing practices in HCV-infected patients based on CYP3A5 polymorphisms.

研究分野：薬理遺伝学

キーワード：CYP3A5 CYP3A5\*3 CYP3A4 薬理遺伝学 薬物動態学 C型肝炎 HCV C型肝炎治療薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

C型肝炎は、C型肝炎ウイルス(HCV)が感染することで発症するウイルス性肝炎である。従来、HCVの排除のためにはインターフェロン(IFN)およびリバビリン(RVB)を併用し、HCV RNAの持続陰性化(Sustained Virologic Response: SVR)を目指した。一方で、HCVには様々なジェノタイプが存在し、特に日本人で約70%のC型肝炎患者に見られるジェノタイプ1b型においては、IFN/RVBでSVRが得られないケースが多い。そのような中、近年新規C型肝炎治療薬が次々と上市されている。これらの新規C型肝炎治療薬はDAAs(Direct Acting Antivirals)と呼ばれ、HCVに直接作用することが特徴である。特に、2015年に販売されたソホスブビル(SOF)/レジパスビル(LDV)配合錠のHCV 1b型に対するSVR率は、ほぼ100%であることが報告されている。しかしながら、SOF/LDVの薬価は極めて高いことから医療財政に及ぼす影響は大きく、また重度の腎機能障害を有する患者への投与は禁忌となっていることから、全ての患者にSOF/LDVを使用することはできない。一方で、他のDAAsについても80%を超えるSVR率が得られており、これらのDAAsのSVR率を更に改善させることで、あえて高価なSOF/LDVを使用しなくとも十分な治療成績が得られることが考えられる。

DAAsの多くは、薬物代謝酵素cytochrome P450(CYP)3Aにより代謝されることが知られている。CYP3A分子種のうち、薬物治療において遺伝的に大きな個体差の原因となり得る分子種はCYP3A5である。CYP3A5遺伝子上にはそのタンパク質発現の可否を決定する重要な遺伝子多型(CYP3A5\*3)が存在し、日本人ではむしろ野生型アレルであるCYP3A5\*1をホモ接合体で有する個体は10-20%と少ない。つまり、CYP3A4および3A5の両方を発現している個体においてはDAAsが過剰に代謝され、HCVを除去するために必要な薬物濃度を維持できず、SVR率が低下している可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

上記を鑑み、本研究では各患者に最適なDAAsを選別することを目指し、DAAsの代謝におけるCYP3A5の遺伝的多様性に着目し、DAAs選択・使用の個別適正化におけるCYP3A5遺伝情報の有用性を検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、CYP3Aで代謝されることが報告されているDAAsのうちアスナプレビル(ASV)、ダクラタスビル(DCV)、ベクラブビル(BCV)、およびパリタプレビル(PTV)の4種類に着目し、以下の検討を行った。

### (1) 各DAAs検出法の確立

LC-MS/MSにおいて、Inertsustain C<sub>8</sub> HP 3 mm(2.1×50 mm)およびガードカラム(30×0.18 mm)を用いて各DAAsおよびその代謝物の検出法を確立することとした。なお、移動相には10 mM酢酸アンモニウムおよびアセトニトリル/メタノール混合溶液(1:1、v/v)をグラジエント条件で用い、内標準物質としてはリトナビル(RTV)を、また検出には表1に示すm/zを用いた。各代謝物においては標品を入手することができなかつたため、ピーク面積を用いることでその生成量を比較した。

表1 各DAAsおよびその代謝物のm/z

ASV			DCV		BCV		PTV		RTV	
ASV	M3	M6	M9	DCV	M3	BCV	M1	PTV		M2
748 648	764 664	734 634	557 457	739 565	755 581	660 535	646 553	767 571	782 502	722 296

## (2) 発現系 CYP3A4 および 3A5 を用いた各 DAAs 代謝活性の相違に関する解析

発現系 CYP3A4 および 3A5 と各 DAAs を反応させ、DAAs の残量およびその代謝物生成量を比較することで、各 DAAs における 3A4-3A5 間の代謝活性の相違を検討した。

## (3) ヒト肝ミクロソームを用いた各 DAAs 代謝活性の相違に関する解析

HAB 研究機構より供与を受けたヒト肝組織 (39 検体) より、DNA およびミクロソーム画分を抽出した。次に、各検体の *CYP3A5*\*3 遺伝子型を PCR-RFLP 法により決定し、また Western blot 分析により各ミクロソームにおける CYP3A4 および 3A5 タンパク質発現量を解析した。最終的にミクロソームと各 DAAs を反応させ、DAAs の残量およびその代謝物生成量を比較することで、*CYP3A5* 遺伝子型が各 DAAs の代謝に及ぼす影響を検討した。

## (4) 統計学的解析

各薬物動態学的パラメーターは GraphPad Prism 5 を用いて算出した。また、各 CYP3A 発現量と DAAs およびその代謝物生成量との関連性を含む統計学的解析には、SPSS v.23.0 を用いた。

## (5) その他

本研究は岡山大学および国際医療福祉大学生命倫理審査委員会の承認を取得し (承認番号 1711-018 および 14-10-131)、かつ両大学遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得た後に行った (承認番号 18089 および D18001)。

## 4. 研究成果

### (1) 各 DAAs 検出法

LC-MS/MS を用いて各 DAAs 検出法の確立を試みたところ、全ての DAAs において明確なピークが認められ、ASV、DCV および PTV においては 0.5-50 ng/mL、BCV においては 1-800 ng/mL の範囲で良好な定量性が確認された (全て  $R^2 > 0.999$ )。また、ヒト肝ミクロソームと各 DAAs を 20 分間反応させ、その残量と生成した代謝物量との間に有意な相関が認められた (表 2)。したがって、これらの代謝物はヒト肝における各 DAAs の主生成代謝物であると判断し、以後の検討を行うこととした。

表 2 各 DAAs とその代謝物生成量との相関

ASV			DCV	BCV	PTV
M3	M6	M9	M3	M1	M2
$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P < 0.0001$	$P = 0.0031$	$P < 0.0001$

### (2) CYP3A4-3A5 間における各 DAAs 代謝活性の相違

各 DAAs と発現系 CYP3A を反応させ、CYP3A4-3A5 間の代謝活性の相違を検討した。ASV においては 3A4-3A5 間でほぼ同程度の ASV の減少が認められ、かつ代謝物生成量についても 3A4-3A5 間で同程度であり、一部の代謝物 (M6) においてはむしろ 3A5 で代謝活性が高かった (図 1)。一方で、DCV、BCV および PTV においては 3A4 で代謝活性が高く、特に DCV においては 3A5 による代謝活性は極めて低かった (図 1)。これまで各 DAAs における 3A4-3A5 間の代謝活性の相違に関する詳細は報告されておらず、本結果より、発現系 CYP3A においては特に ASV で CYP3A5 がその代謝で重要な役割を果たすことが示唆された。

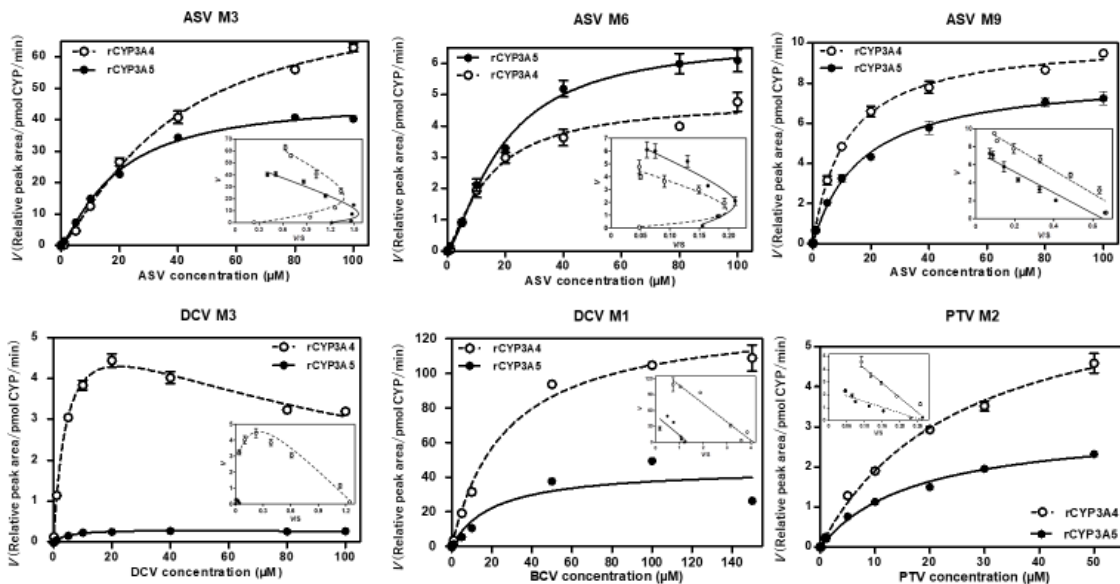


図1 発現系 CYP3A における各 DAAs の代謝活性に関する CYP3A4-3A5 間の相違

(3) CYP3A4 および 3A5 タンパク質発現量と代謝活性との関連性

発現系 CYP3A を用いて得られた結果が、実際のヒト肝ミクロソームにおいて反映されるかを解析するため、CYP3A5\*3 遺伝子型に基づき各ミクロソームを 2 群に分け (CYP3A5 発現群および非発現群) CYP3A5 遺伝子型が各 DAAs の代謝に及ぼす影響を検討した。ASV においては、全ての代謝物の生成過程において CYP3A5 発現群でその活性が高かった (図 2)。一方で、DCV、BCV および PTV の代謝物生成過程においては、CYP3A5 発現群と非発現群との間に明確な差は認められなかった (図 2)。

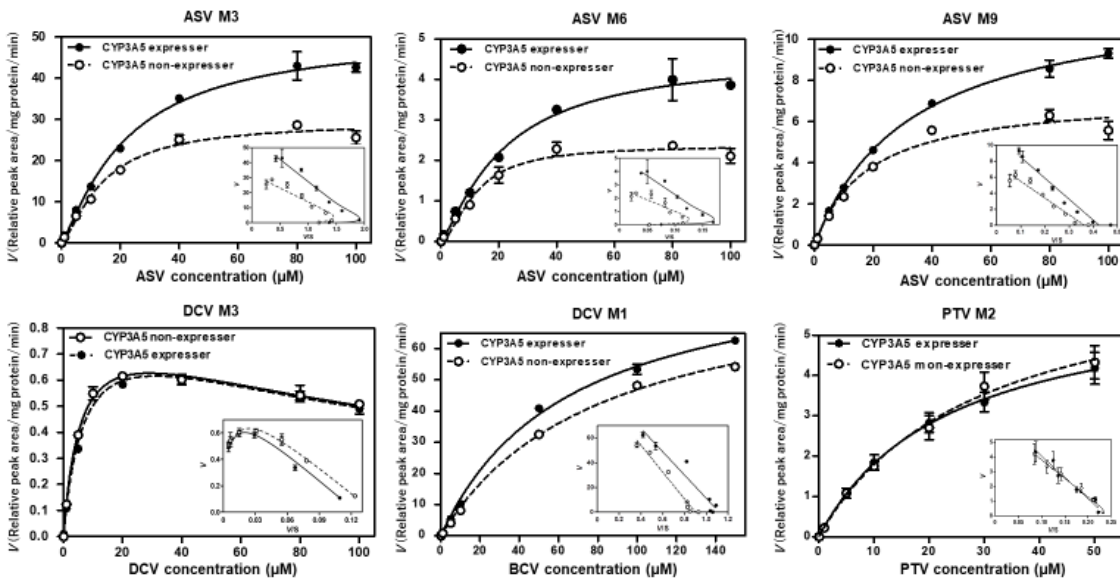


図2 ヒト肝ミクロソームにおける CYP3A5 遺伝子型が各 DAAs の代謝に及ぼす影響

また、ASV の各代謝物生成量と CYP3A4 および 3A5 タンパク質発現量との間に有意な相関が認められた (表 3)。一方で、DCV、BCV および PTV の各代謝物の生成量においては、CYP3A4 タンパク質発現量とのみ有意な相関が認められた (表 3)。これらの結果より、CYP3A5 の発現量は ASV の代謝においては重要であり、一方で、DCV、BCV および PTV の代謝においてはその寄与は小さいことが明らかとなった。

表 3 各 DAAs 代謝物と CYP3A 発現量との関連性

	ASV			DCV	BCV	PTV
	M3	M6	M9	M3	M1	M2
CYP3A4	<b>P = 0.0006</b> R <sup>2</sup> = 0.276	<b>P &lt; 0.0001</b> R <sup>2</sup> = 0.389	<b>P = 0.0003</b> R <sup>2</sup> = 0.304	<b>P &lt; 0.0001</b> R <sup>2</sup> = 0.045	<b>P &lt; 0.0001</b> R <sup>2</sup> = 0.464	<b>P = 0.0004</b> R <sup>2</sup> = 0.331
CYP3A5	<b>P = 0.0329</b> R <sup>2</sup> = 0.117	<b>P = 0.0357</b> R <sup>2</sup> = 0.114	<b>P = 0.0418</b> R <sup>2</sup> = 0.107	P = 0.8777 R <sup>2</sup> = 0.001	P = 0.3720 R <sup>2</sup> = 0.021	P = 0.3447 R <sup>2</sup> = 0.024
CYP3A(3A4 + 3A5)	<b>P &lt; 0.0001</b> R <sup>2</sup> = 0.374	<b>P &lt; 0.0001</b> R <sup>2</sup> = 0.473	<b>P &lt; 0.0001</b> R <sup>2</sup> = 0.309	<b>P = 0.0006</b> R <sup>2</sup> = 0.275	<b>P &lt; 0.0001</b> R <sup>2</sup> = 0.397	<b>P = 0.0003</b> R <sup>2</sup> = 0.302

以上を総括し、本研究により、ASVの代謝においてはCYP3A5が重要な役割を果たし、CYP3A5 遺伝子型が ASV の効果を規定する要因となり得る可能性が初めて明らかになった。一方で、DCV、BCV および PTV の代謝においてはCYP3A4 が重要な役割を果たし、CYP3A5 が代謝に及ぼす影響は小さいことが示唆された。今後、各 DAAs の患者血中濃度と CYP3A5 遺伝子型との関連性を臨床研究として解析する必要はあるが、本研究で得られた成果より CYP3A5 遺伝情報の一部の DAAs の個別適正化に有用である可能性が考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

以下、全て査読有り

- (1) Jun Matsumoto, Hiroyoshi Nakamura, Su Nwe San, Hikari Sato, Manami Takezawa, Ryuto Kishi, Yutaro Kito, Junko Sugano, Mai Izuki, Nao Yanagisawa, Naoki Ikeda, Yusuke Saito, Yoshinori Kato, Harumi Yamada, Masachika Fujiyoshi, and Noritaka Ariyoshi. A proposed simple screening method to determine relative contributions of CYP3A4 and CYP3A5 to drug metabolism *in vitro*. *Personalized Medicine Universe* in press (2019)
- (2) Su New San, Jun Matsumoto, Yumi Saito, Masako Koike, Hiroaki Sakaue, Yoshinori Kato, Masachika Fujiyoshi, Noritaka Ariyoshi, and Harumi Yamada. Minor contribution of CYP3A5 to the metabolism of hepatitis C protease inhibitor paritaprevir *in vitro*. *Xenobiotica* in press (2018) doi: 10.1080/00498254.2018.1524947
- (3) Su Nwe San, Jun Matsumoto, Masako Koike, Yumi Saito, Hiroaki Sakaue, Yoshinori Kato, Noritaka Ariyoshi and Harumi Yamada. Determination of sofosbuvir via a high-performance liquid chromatography method using ultraviolet detection. *Journal of International University of Health and Welfare* **23** (1): 130-6 (2018) <http://id.nii.ac.jp/1065/00000857/>

〔学会発表〕(計4件)

- (1) Jun Matsumoto, Su New San, Ayano Kawauchi, *et al.* Contribution of CYP3A5 to the metabolism of direct acting anti-hepatitis C virus drugs asunaprevir, daclatasvir, and beclabuvir (Ximency®) *in vitro*. The 24<sup>th</sup> International Congress of Personalized Medicine (2018)
- (2) Su Nwe San, Jun Matsumoto, Yumi Saito, *et al.* Minor contribution of human cytochrome 3A5 to the metabolism of hepatitis C protease inhibitor paritaprevir *in vitro*. 2018 International Meeting on 22<sup>nd</sup> MDO and 33<sup>rd</sup> JSSX (2018)
- (3) Su Nwe San, Jun Matsumoto, Yumi Saito, *et al.* Minor contribution of cytochrome P450 3A5 to the

metabolism of hepatitis C NS5B inhibitor beclabuvir *in vitro*. 第 28 回日本医療薬学会年会  
(2018)

- (4) 松本准、池田直輝、伊月舞ら、CYP3A5 遺伝情報に基づいた抗てんかん薬トピラマートにおける薬物治療の個別適正化に関する研究、第 6 回国際医療福祉大学学会学術大会(2016)

〔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〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：有吉 範高

ローマ字氏名：Noritaka Ariyoshi

所属研究機関名：岡山大学大学院

部局名：医歯薬学総合研究科（薬学系）

職名：教授

研究者番号（8 桁）：00243957

研究協力者氏名：藤吉 正哉

ローマ字氏名：Masachika Fujiyoshi

所属研究機関名：岡山大学大学院

部局名：医歯薬学総合研究科（薬学系）

職名：准教授

研究者番号（8 桁）：50751921

研究協力者氏名：中村 裕義

ローマ字氏名：Hiroyoshi Nakamura

所属研究機関名：国際医療福祉大学/国際医療福祉大学三田病院

部局名：薬学部/薬剤部

職名：教授/薬剤部長

研究協力者氏名：山田 治美

ローマ字氏名：Harumi Yamada

所属研究機関名：国際医療福祉大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号（8 桁）：70433620

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。