

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08476

研究課題名(和文) 心臓移植時のアミオダロンによる不整脈管理が免疫抑制剤の薬物動態に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Effect of arrhythmia control by amiodarone on the pharmacokinetics of immunosuppressants in heart transplant patients.

研究代表者

河内 正二 (Kawauchi, Shoji)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：30549308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：有害事象自発報告データベースを用いて、アミオダロン塩酸塩(アミオダロン)による非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の発現リスクを調査した。アミオダロンでは、NASHの有害事象シグナルが検出され、アミオダロン服用患者ではNASHの発現リスクが高いことを明らかにした。さらに、NASHモデルマウスの肝臓では、薬物代謝酵素と胆汁輸送に関連するトランスポーターの発現が低下していることを明らかにした。NASHでは肝臓での薬物代謝機能の低下に加え、胆汁の循環障害が生じている可能性が示唆された。また、このメカニズムとして小腸粘膜恒常性の低下が一部関与している可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓移植後の拒絶反応の防止を目的として使用されるシクロスポリンとタクロリムスは肝臓と小腸でCYP3Aによる代謝を受け、胆汁中に排泄される。ミコフェノール酸モフェチルは腸肝循環する。つまり、NASHでは、肝臓での薬物代謝機能の低下および肝臓と小腸での胆汁の循環障害により免疫抑制剤の体内動態が変動することが予想される。しかし、心臓移植前のアミオダロンの投与が心臓移植後の免疫抑制剤の治療に及ぼす影響については明らかにされていない。すなわち、本研究結果は、心臓移植後の免疫抑制剤による適正な薬物療法の推進に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Adverse events of amiodarone-induced NASH were examined using spontaneous adverse event database. We showed that positive signal detection for amiodarone-associated NASH, and those data suggested that amiodarone are strongly associated with an increased risk of NASH. In addition, the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters associated with bile transport were reduced in the liver of mice with NASH. These results indicate the possible dysfunction of drug metabolism and enterohepatic circulation in the NASH. We showed that this mechanism is likely associated with disruption of small intestinal barrier function.

研究分野：医療薬学

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎(NASH) アミオダロン塩酸塩 薬物動態

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心臓移植後患者では、拒絶反応の防止目的で免疫抑制剤のシクロスポリンあるいはタクロリムスにミコフェノール酸モフェチルが併用されるが、これらの薬剤は高い有効性の反面、治療有効域が狭く、その逸脱により拒絶反応や重篤な副作用が発生するリスクを有する。また、その体内動態には個体差が存在し、薬物血中モニタリングに基づく投与設計が不可欠となる。一方、心臓移植待機中の患者では、抗不整脈薬による心不全の管理が重要である。アミオダロン塩酸塩(アミオダロン)は致死性不整脈に対して高い抑制効果を示すが、循環器や呼吸器への副作用発現頻度が高い。アミオダロンの消失半減期は約 60 日と極めて長く、体内に長期間存在する。そのため、一度副作用が発現すると、心臓移植が実施され投与を中止した場合でも遷延化している可能性がある。

非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は、近年、わが国でも食生活の欧米化に伴い有病率が上昇している。NASH は、脂肪肝に留まらず、肝硬変や肝細胞癌へと進行し、生命予後に影響しうる疾患である。NASH では、肝臓の炎症が生じるが、薬物の体内動態に与える影響は不明のままである。NASH 発症には、生活習慣と並んで薬剤の関与が知られている。アミオダロンは NASH を誘発することが指摘されているが、副作用として NASH に関する報告は少ない。

つまり、心臓移植前のアミオダロンによる不整脈管理により NASH が発症した場合、心臓移植後の薬物療法、とりわけ免疫抑制剤の薬物動態に影響を及ぼす可能性があるが、その詳細は十分に分かっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、心臓移植前のアミオダロンの投与による NASH の発症が心臓移植後の免疫抑制剤の薬物動態に及ぼす影響を明らかにするため、モデル動物と医薬品有害事象データベースを用いて以下の検討を行った。

- (1) 肝臓での薬物代謝酵素と胆汁輸送関連トランスポーターの発現変化を明らかにする。
- (2) 肝臓での薬物代謝酵素と胆汁輸送関連トランスポーターの発現変化の機序を明らかにする。
- (3) アミオダロンによる NASH の有害事象リスクと NASH 発症のカットオフ値を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) NASH モデルマウスの作製

NASH はメチオニン、コリン欠乏食(MCD食)により誘導した。NASH に対する小腸粘膜恒常性の影響を評価するため、小腸炎に対して抗炎症効果を有するアルギン酸ナトリウム(SA)を用いて(Horibe S, et al. Int J Med Sci, 13, 653-63, 2016.) マウスに通常食(コントロール群)、MCD食(MCD群)、5% SAを混合したMCD食(SA群)を8週間自由摂取させた。

#### (2) 肝臓および小腸の組織学評価

肝臓は組織切片のhematoxylin-eosin(HE)染色を行い、脂肪化、炎症および肝細胞の風船様変性より算出したnon-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score (NAFLD 活動性スコア)を用いて組織学的に評価した。

小腸は組織切片作製後、HE染色およびperiodic acid schiff (PAS)染色を行い、絨毛構造の形態変化や粘膜粘液の分泌が変化しているかを評価した。小腸粘膜の高さはHE染色の画像を用いてImageJにより計測した。小腸バリア機能は、タイトジャンクションタンパク質であるZO-1を蛍光免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

#### (3) 肝機能マーカーおよび肝臓での炎症の評価

血漿中のAST値、ALT値を測定した。肝臓から全RNAを調製後、TNF- $\alpha$ とcollagen 1 $\alpha$ 1の発現量をリアルタイムPCR法により評価した。肝マクロファージの浸潤はF4/80を蛍光免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像を撮影し、シグナル陽性部の面積を定量した。

#### (4) 薬物代謝酵素と胆汁輸送関連トランスポーターの発現解析

肝臓から全RNAおよびタンパク質を抽出し、CYP3A、Bsep、Ntcpの発現をリアルタイムPCR法およびウエスタンブロットで評価した。

#### (5) アミオダロンによる NASH の有害事象リスクと NASH 発症のカットオフ値の算出

Food and Drug Administration (FDA) が公開している有害事象自発報告データベース(AERS: 2004-2015)に登録された6,153,696件のデータを使用した。薬剤と有害事象との因果関係を客観的に評価できる指標としてReporting Odds Ratio (ROR)を算出した。有害事象のシグナル検出の基準は、RORの95%信頼区間の下限值が1以上とした。なお、解析対象としたNASHに関する有害事象名はMedDRAに準拠している。

#### 4. 研究成果

##### (1) 薬物代謝酵素と胆汁輸送関連トランスポーターの発現変化

MCD 食の摂食により、肝臓では脂肪蓄積と炎症が生じ、NAFLD 活動性スコアの上昇が認められた。また、MCD 群では、肝機能障害のマーカーである AST 値、ALT 値の上昇ならびに TNF- $\alpha$  および collagen 1 の発現上昇、肝マクロファージの浸潤を認め、脂肪沈着に加えて肝細胞の炎症や線維化を伴う NASH 病態が確認できた。MCD 群の肝臓では薬物代謝酵素の CYP3A、胆汁輸送に関連するトランスポーターの Bsep および Ntcp の遺伝子およびタンパクの発現量はコントロール群に比べて低下しており、NASH では肝臓での薬物代謝機能の低下に加え、胆汁の循環障害が生じている可能性が示唆された。

##### (2) 薬物代謝酵素と胆汁輸送関連トランスポーターの発現低下機序の解明

MCD 群の肝臓における CYP3A、Bsep および Ntcp の発現低下機序を明らかにするため、腸肝連関に着目して検討した。アルギン酸ナトリウムを MCD 食に混合して摂食させた群 (SA 群) では、MCD 群に比べて、NAFLD 活動性スコアは低下した。また、AST 値の上昇、TNF- $\alpha$  の発現上昇および肝マクロファージの浸潤も抑制されていた。一方、MCD 群の小腸では、小腸粘膜絨毛の短縮や PAS 染色陽性細胞数の減少、ZO-1 シグナルの低下が生じており、小腸粘膜バリア機能の低下が認められた。SA 群ではこれらが改善していた。このことから、小腸粘膜バリア機能の低下に伴う小腸由来の炎症性メディエーターの肝臓への移行が NASH の病態進行に関与している可能性が示唆された。そして、このことが肝臓での CYP3A、Bsep および Ntcp の発現にも影響を及ぼしている可能性が考えられた。

##### (3) アミオダロンによる NASH の有害事象リスクと NASH 発症のカットオフ値の算出

アミオダロンでは、NASH の有害事象シグナルが検出され、その ROR は 2.55 (2.09-3.11) であった。アミオダロン服用患者では NASH の発現リスクが高いことが示唆された。NASH 発症のカットオフ値を算出するため、アミオダロンの有害事象として NASH が生じた症例のより詳細な解析を実施した。その結果、性別では、男性 51 名、女性 47 名、年齢 (中央値) は 65 歳であった。これより、アミオダロンによる NASH 発症は高齢者において高い傾向にあるが、性別には大きな差はないと考えられた。次に、投与期間と累積投与量に着目して解析した。しかし、AERS は自発報告データベースであるため、これらの情報が収集されていない症例が存在し、解析に十分な症例数が得られずカットオフ値を算出するまでには至らなかった。予備的な結果ではあるが、得られた症例から、一日の投与量としては 200mg を服用していた症例が約 70%と大部分を占め、服用期間 (中央値) は 356.5 日であった。アミオダロンの 1 日 200mg の服用は欧米・本邦における治療維持期の概ね至適用量に該当する。すなわち、アミオダロンによる NASH 発症には高齢者において長期的な服用がリスクとなる可能性が考えられた。

以上の結果より、アミオダロンによる薬剤性 NASH によって、肝臓において薬物代謝機能の低下と胆汁の循環障害が生じ、免疫抑制剤の体内動態に影響を及ぼす可能性が示唆された。今後、患者診療情報による調査研究から、心臓移植前のアミオダロンの投与による NASH の発症と心臓移植後の免疫抑制剤の薬物動態との関連を臨床的に検討する予定である。

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 1件）

1. 著者名 Kawauchi S, Horibe S, Sasaki N, Tanahashi T, Mizuno S, Hamaguchi T, Rikitake Y.	4. 巻 17
2. 論文標題 Inhibitory Effects of Sodium Alginate on Hepatic Steatosis in Mice Induced by a Methionine- and Choline-deficient Diet.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mar Drugs.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/md17020104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kawauchi S, Horibe S, Sasaki N, Tanahashi T, Hamaguchi T, Rikitake Y.
2. 発表標題 Inhibitory effects of sodium alginate on methionine and choline-deficient diet-induced hepatic steatosis in mice
3. 学会等名 10th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection /Organoprotection 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河内正二, 尾松直樹, 細見光一, 高田充隆, 瀧口常男
2. 発表標題 データマイニング手法によるNASHの原因医薬品の探索ならびに自己組織化マップの有用性
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河内正二, 堀部紗世, 佐々木直人, 棚橋俊仁, 瀧口常男, 力武良行
2. 発表標題 アルギン酸ナトリウムのマウス非アルコール性脂肪肝炎モデルに対する抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----