

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08949

研究課題名(和文)薬物分解エステラーゼPON3の遺伝子多型と薬物動態に関する臨床薬理的検討

研究課題名(英文)Clinical pharmacology study on drug-degrading esterase PON3, gene polymorphism and pharmacokinetic influence

研究代表者

渡邊 裕司(Watanabe, Hiroshi)

浜松医科大学・医学部・理事

研究者番号：50262803

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)：抗動脈硬化作用が注目されるパラオキシナーゼ(PON)3の日本人血清中濃度は $9.6 \pm 3.8$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、コーカシアン人種における既報値に比較し5倍程度高値であった。PON3遺伝子多型の頻度は最頻でも5%以下であり、PON3濃度の民族差要因にはエピジェネティックな要因が関与する可能性が示唆される。また血清中PON3濃度は体重およびBMIと負の相関を示し、シンバスタチンおよびシンバスタチン酸の体内動態との関連では、血清PON3濃度が高いとシンバスタチン酸への代謝活性が高くなることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では抗動脈硬化作用が注目されるパラオキシナーゼ(PON)3に関する日本人の血清中PON3濃度、個人間変動要因、シンバスタチンの体内動態との関連、また日本人のPON3遺伝子多型と頻度について検討し、PON3に関する日本人の基盤データを構築した。日本人の血清PON3濃度がコーカシアン系人種に比較し高く、動脈硬化や肥満との関連とともに、シンバスタチンの薬物動態の人種差要因となることを初めて示したものである。

研究成果の概要(英文)：Paraoxonase 3 (PON3) possesses atheroprotective properties. Serum concentration of PON3 was  $9.6 \pm 3.8$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  in Japanese, which was about 5 times higher than the reported value in Caucasian. Because the frequency of PON3 gene polymorphisms was relatively low, it was suggested that epigenetic factors might be involved in this ethnic difference in PON3 concentration. In addition, serum PON3 concentration showed a negative correlation with body weight and BMI, and a positive correlation with the metabolism of simvastatin to simvastatin acid..

研究分野：臨床薬理学

キーワード：臨床薬理学 パラオキシナーゼ シンバスタチン 薬物動態 抗動脈硬化作用 遺伝的多型

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

パラオキシナーゼ (PON) はパラオキソンなど有機リン化合物を加水分解することで解毒を担うエステラーゼとして見出された。現在、ヒトでは PON1、PON2 および PON3 の 3 種が同定されており、その遺伝子は第 7 染色体上のクラスターに位置している。このうち PON3 は主に肝臓に発現し、その一部は血液中に分泌され、高密度リポタンパク質 (HDL) と結合することが明らかになっている。PON3 は生理学的にはカルシウムイオン依存性に LDL-コレステロールの酸化を抑制することから、動脈硬化の開始と進行を遅らせ抗動脈硬化作用を有することが近年注目されている。また、PON3 はスタチナーゼとも呼ばれ、高脂血症治療薬のシンバスタチンやカリウム保持性利尿薬のスピロノラクトンなどラクトン構造を有する薬物の加水分解反応に関与する。スタチン系薬物については、薬物動態や薬効発現において著しい個人差および民族差が存在することが知られている。我々のグループでは先行研究において日本とイタリアの健常成人を対象にシンバスタチンの体内動態を検討する臨床試験を実施し、日本人被験者に対するシンバスタチン投与量はイタリア人被験者の半量であったにもかかわらず、シンバスタチン加水分解体であるシンバスタチン酸の血中濃度推移はほぼ同程度になることを観察した。これらの知見から、シンバスタチン酸の生成および体内動態が人種間で異なることの要因の一つとして、PON3 発現や活性における人種差、または PON3 活性変動を伴う遺伝子多型などによる個人間変動が影響している可能性を推察した。PON3 に関する科学的知見は限られており、本研究で日本人における PON3 の発現や活性を解析し、スタチン系薬物の体内動態との関連を明らかにすることは、日本人に最適なスタチン個別化薬物治療を提供する上でも重要な情報となりうるとともに、動脈硬化の人種差を説明する一要因となる可能性も示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究では抗動脈硬化作用が注目されるパラオキシナーゼ (PON)3 に関する日本人の基盤データの構築を目的として、血清中 PON3 濃度の解析と個人間変動要因の分析、シンバスタチンの体内動態との関連、また日本人の PON3 遺伝子多型と頻度について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) シンバスタチン酸生成速度の解析

日本人健常成人から供与された血清を用いて、*in vitro* でのシンバスタチンの加水分解実験系を構築し、各被験者の血清におけるシンバスタチン酸の生成を検討した。被験者は 50 名 (男性 35 名、女性 15 名) であり、平均年齢は 30.7 歳 (21 ~ 64 歳)、体重は  $61.6 \pm 10.8$  kg、BMI は  $22.2 \pm 2.6$  kg/m<sup>2</sup> であった。血清にシンバスタチンを添加し、37 °C で 30 分間インキュベートすることでカルシウム依存的な加水分解、シンバスタチン酸の生成速度を解析した。

### (2) 血清中 PON3 濃度測定

血清中 PON3 濃度は ELISA 法 (human paraoxonase 3 ELISA kit、MyBioSource) を用いて定量し、血清中総タンパク濃度および HDL-コレステロール濃度、被験者の体重および BMI との相関を解析した。

### (3) シンバスタチンおよびミダゾラムの薬物動態解析

健常成人 10 名 (男性 8 名、女性 2 名; 平均年齢 25.1 歳、平均 BMI 22.1 kg/m<sup>2</sup>) に対してシ

シンバスタチンを単回経口投与し、シンバスタチンおよびシンバスタチン酸の体内動態を検討した。シンバスタチンは加水分解に加えてシトクロム P450 (CYP) 3A による酸化的代謝を受けることから、被験者個人の CYP3A 活性の違いによるシンバスタチンの体内動態への影響に関しても考慮する必要があるため、CYP3A の in vivo 活性指標薬であるベンゾジアゼピン系鎮静薬ミダゾラムの薬物動態試験を併せて実施した。試験では第 1 日目にシンバスタチン (10 mg) を、第 2 日目にミダゾラム (50 µg/kg) を絶食下経口投与し、投与後、経時的採血を行い、シンバスタチン、シンバスタチン酸、ミダゾラムおよび CYP3A による代謝物である 1'-水酸化ミダゾラムの血漿中濃度を液体クロマトグラフィー=タンデム質量分析器 (ABSCIEX 3200 Q TRAP System) により定量した。各薬物の薬物動態パラメーターは WinNonlin ソフトウェアを用いてノンコンパートメント解析により算出した。

#### (4) PON3 遺伝子多型および頻度に関する調査分析

PON3 遺伝子多型に関してはリファレンスゲノム配列について GRCh37/hg19 を用いた。日本人については、日本人ゲノム配列の個人による違い (バリエーション) とそれに関係する疾患情報などを収集・整理したデータベース TogoVar (日本人ゲノム多様性統合データベース: <https://togovar.biosciencedbc.jp/>) を用いて、遺伝子多型および頻度について解析を行った。それ以外の人種については、ensembl (<https://asia.ensembl.org/index.html>) を用いて遺伝子多型および頻度について解析を行った。バリエーションによってアミノ酸配列が変化する場合、それがタンパク質の機能に与える影響を予測するために、それらをスコア化するソフトウェアである SIFT、および、PolyPhen を用いた。SIFT では、スコア値が <0.05 で Deleterious (有害) とされており、Polyphen では、1 に近づくほど影響が大きく、スコア値 >0.446 で影響が大きいとされている。よって、それぞれのスコアの閾値が SIFT <0.05、かつ、PolyPhen >0.446 である SNP も調査した。

## 4. 研究成果

日本人健常成人血清におけるシンバスタチン酸の生成速度はシンバスタチン添加濃度増加にともなって上昇し、酵素反応速度論的解析ではミカエリス定数  $K_m$  値は 23.8 µM、 $V_{max}$  値は 126.4 pmol/min/mg protein と算出された。シンバスタチン酸生成速度の個人間変動は 2.5 ~ 3.5 倍の範囲であった。

血清中 PON3 濃度は  $9.6 \pm 3.8$  µg/mL (平均 ± 標準偏差) となり、5 倍程度の個人間変動がみられた。使用した ELISA kit が異なるため、同一 kit で直接比較するなど、さらなるバリデーションが必要ではあるが既報のコーカシアン人種における血清中 PON3 濃度 1.78 µg/mL (Aragones G. *et al.*, *J Lipid Res*, 2011) と比較し日本人では血清中の PON3 は高濃度存在する可能性が示された。血清中総タンパク濃度および HDL-コレステロール濃度はそれぞれ  $7.8 \pm 0.7$  g/dL および  $64 \pm 15$  mg/dL であり、個人間変動はそれぞれ 1.4 倍および 3.3 倍といずれも PON3 濃度の変動より小さかった。また被験者での血清中 PON3 濃度と血清中総タンパク濃度または HDL-コレステロール濃度との間に相関はみられなかった一方、被験者の体重および BMI との間には血清中 PON3 濃度と負の相関が認められた。このことは体重が増加し肥満傾向にある個人ほど、血清中 PON3 濃度は低いことを示唆している。PON3 ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて体重が有意に上昇したことを示した Shih らの報告を支持する結果となった (Shih D.M. *et al.*, *FASEB J*, 2015)。

同意が得られた健常成人 10 名 (男性 8 名、女性 2 名; 平均年齢 25.1 歳、平均 BMI 22.1 kg/m<sup>2</sup>) に対してシンバスタチンおよびミダゾラムを単回経口投与したところ、シンバスタチン

およびシンバスタチン酸の平均最高血中濃度 ( $C_{max}$ ) はそれぞれ  $4.6 \pm 3.0$  ng/mL および  $1.6 \pm 0.4$  ng/mL であり、最高血中濃度到達時間 ( $T_{max}$ ) の中央値は 1.5 hr であった。また、投与後 8 時間までの血中濃度 - 時間曲線下面積 ( $AUC_{0-8}$ ) についてはシンバスタチンが  $10.8 \pm 6.9$  ng $\times$ hr/mL、シンバスタチン酸が  $8.2 \pm 2.2$  ng $\times$ hr/mL と算出された。シンバスタチンの経口クリアランスは  $234.1 \pm 117.4$  mL/min/kg であった。一方、ミダゾラムの  $C_{max}$ 、 $T_{max}$ 、 $AUC_{0-8}$  および経口クリアランス ( $CL/F$ ) はそれぞれ  $25.5 \pm 13.2$  ng/mL、0.5 hr、 $46.9 \pm 21.5$  ng $\times$ hr/mL および  $15.7 \pm 7.1$  mL/min/kg となった。これまでの報告と同様に薬物動態には大きな個人間変動が認められ、 $AUC_{0-8}$  ではシンバスタチンで 6.7 倍、シンバスタチン酸で 2.4 倍、またミダゾラムでは 4.6 倍の差が観察された。被験者個人ごとの解析では、シンバスタチンの  $AUC_{0-8}$  とミダゾラム  $AUC_{0-8}$  との間には強い相関が認められ ( $r = 0.92$ ,  $P < 0.001$ )、両薬物の代謝には主に CYP3A が関与することが確認された。また、両薬物の  $CL/F$  についても有意に相関することが明らかとなったが ( $r = 0.71$ ,  $P = 0.02$ )、被験者 1 名についてはシンバスタチンの  $CL/F$  がミダゾラムの  $CL/F$  よりも著しく高い値を示した。そのため、当該被験者の血清 PON3 濃度を調べたところ平均血清 PON3 濃度より約 1.7 倍高い結果となった。さらに、シンバスタチン酸の血中濃度についても平均値に比較して高値で推移していた。ヒト肝臓 PON3 発現量と血清 PON3 濃度がどの程度関連するかは今後の検討課題であるものの、血清 PON3 濃度とシンバスタチンの  $CL/F$  およびシンバスタチン酸の血漿中濃度との間に何らかの関連性があることを示唆する結果であった。各被験者におけるシンバスタチンとシンバスタチン酸の AUC 比を算出し、血清 PON3 濃度とプロットしたところ、有意な正の相関が認められた ( $r = 0.77$ ,  $P = 0.02$ )。血清 PON3 濃度が高いと、*in vivo* でのシンバスタチン酸への代謝活性が高くなることが示唆された。

日本人において、PON3 の SNP については、1247 報告されていた。そのうち、病的意義のある SNP、および、薬剤感受性に病的意義のある SNP については、未だ報告がされていなかった。それぞれのスコアの閾値が  $SIFT < 0.05$ 、かつ、 $PolyPhen > 0.446$  である SNP は、54 検出した。頻度が  $> 0.001$  以上の SNP は 4 検出され、rs139856535、rs17883013、rs141350740、rs146627952 であった。日本人の頻度はそれぞれ、0.003、0.005、0.017-0.044、0.002 であった。日本人以外の人種について頻度を調査したところ、それぞれ、rs139856535 はヨーロッパで 0.007、rs17883013 はアフリカで 0.05、rs146627952 はアフリカで 0.03 と頻度が高かった。一方、rs141350740 については、他の人種ではほとんど報告がなく、日本人の頻度が最も高かった。血清 PON3 濃度と PON3 遺伝子多型との関連については、多型頻度が最も高いものでも 1.7-4.4% であり、遺伝子多型が PON3 濃度を規定する可能性は現時点では低く、エピジェネティックな要因が関与することが示唆された。

以上の結果から、抗動脈硬化作用が注目される PON3 に関して、日本人健常成人における血清 PON3 濃度はコーカシアン系人種に比較し高い可能性があり、動脈硬化発症の人種差に関連する可能性が示唆された。さらに、血清 PON3 濃度が高いほどシンバスタチンからシンバスタチン酸への代謝比は高く、シンバスタチンの薬物動態における人種差の要因として PON3 発現量の違いが関与する可能性を初めて示唆するものとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kamiya C, Odagiri K, Hakamata A, Inui N, Watanabe H	4. 巻 1
2. 論文標題 Clinical Outcomes and Treatment Options in Patients With Pulmonary Hypertension Who Received Pulmonary Hypertension-Specific Drugs - Single-Center Case Series -	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Reports	6. 最初と最後の頁 389-395
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katayama, Odagiri, Hakamata, Inui, Yamauchi, Watanabe	4. 巻 8
2. 論文標題 Transient Laterality of Cerebral Oxygenation Changes in Response to Head-of-Bed Manipulation in Acute Ischemic Stroke	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1739 ~ 1739
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm8101739	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama N, Inui N, Mori K, Nakamura Y, Hayakawa H, Tanaka S, Uchida S, Namiki N, Watanabe H, Suda T,	4. 巻 11(9)
2. 論文標題 Effect of rifampicin and clarithromycin on the CYP3A activity in patients with Mycobacterium avium complex,	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Thorac Dis	6. 最初と最後の頁 3814-3821
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 栗原千絵子, 鈴木千恵子, 小池竜司, 佐藤弥生, 渡邊裕司	4. 巻 47(1)
2. 論文標題 臨床研究法の現状における課題と運用改善に向けた提言：GCP・医学系指針及び海外制度との比較から - 第1報 医薬品等の品質・安全性の確保 -	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床評価	6. 最初と最後の頁 127-152
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 三坂眞元	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 薬と緑茶の相互作用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 機能性食品と薬理栄養	6. 最初と最後の頁 35-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Katayama N, Odagiri K, Hakamata A, Inui N, Yamauchi K, Watanabe H
2. 発表標題 Impairment of cerebral blood flow autoregulation in patients with acute cerebral infarction recovered within 7-10 days after onset
3. 学会等名 International Stroke Conference (AHA) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Watanabe H
2. 発表標題 Role of NO- sGC- cGMP axis in Pulmonary Arterial Hypertension
3. 学会等名 2019 TPHA-Autumn conference -PCPHS-TPHA Joint PH Forum (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神谷千明, 袴田晃央, 片山直紀, 乾直輝, 小田切圭一, 田中紫茉莉, 内田信也, 並木徳之, 渡邊裕司
2. 発表標題 健常者におけるSelexipag とClopidogrel併用時の薬物動態について
3. 学会等名 第4回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中紫茉莉, 内田信也, 中川篤毅, 袴田晃央, 神谷千明, 小田切圭一, 乾直輝, 渡邊裕司, 並木徳之
2. 発表標題 成人肺高血圧患者における肺高血圧症治療薬の母集団薬物動態解析
3. 学会等名 第4回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小田切圭一, 神谷千明, 袴田晃央, 乾直輝, 田中紫茉莉, 内田信也, 渡邊裕司
2. 発表標題 ベラプロストをセレキシパグに変更したPAH患者での薬物濃度
3. 学会等名 第4回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片山直紀, 小田切圭一, 神谷千明, 袴田晃央, 乾直輝, 田中紫茉莉, 内田信也, 渡邊裕司
2. 発表標題 健康成人におけるシトクロムP4502C8阻害薬クロビドグレル併用時のセレキシパグの薬物動態について
3. 学会等名 第40回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shingen Misaka, Yuko Ono, Tomoyuki Ono, Hiroshi Ogata, Kenju Shimomura
2. 発表標題 Influence of green tea on pharmacokinetics of fexofenadine in healthy volunteers
3. 学会等名 14th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶋崎 翔, 和泉 啓司郎, 下村 健寿, 三坂 眞元
2. 発表標題 ナドロールの尿中排泄量を指標とするトランスポーターを介した薬物相互作用評価
3. 学会等名 第40回日本臨床薬理学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三坂 眞元, 大野 雄康, 小野 委成, 尾形 浩, 下村 健寿
2. 発表標題 健康人において緑茶カテキンがフェキソフェナジンの体内動態に及ぼす影響
3. 学会等名 第3回日本臨床薬理学会北海道・東北地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kamiya C, Watanabe H
2. 発表標題 Genotype-specific effects of cytochrome P450 inducers and inhibitors on CYP2C19 enzyme activity.
3. 学会等名 第39回日本臨床薬理学会学術総会・WCP2018(ポスター)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田信也, 袴田晃央, 田中紫茉莉, 神谷千明, 石川貴充, 小田切圭一, 乾直輝, 森善樹, 並木徳之, 渡邊裕司
2. 発表標題 肺高血圧症治療薬における薬物治療モニタリング(TDM)の検討
3. 学会等名 第2回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 袴田晃央, 石川貴充, 田中紫茉子, 神谷千明, 小田切圭一, 内田信也, 乾直輝, 渡邊裕司
2. 発表標題 薬物増量にTDMを用いた肝・腎機能障害合併肺高血圧症の例
3. 学会等名 第2回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神谷千明, 小田切圭一, 宮川幸子, 袴田晃央, 乾直輝, 田中紫茉子, 内田信也, 並木徳之, 渡邊裕司
2. 発表標題 cytochrome P450における遺伝子多型と酵素誘導/阻害の関連
3. 学会等名 第38回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 袴田晃央, 石川貴充, 田中紫茉子, 神谷千明, 小田切圭一, 内田信也, 乾直輝, 渡邊裕司
2. 発表標題 治療的薬物濃度モニタリング(TDM)を用いて薬剤調整を行った肝・腎機能障害合併肺高血圧症の1例
3. 学会等名 第38回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 越前宏俊、渡邊裕司	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 1-85
3. 書名 今日の治療指針2019	

1. 著者名 渡邊裕司	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本医事新報	5. 総ページ数 68
3. 書名 治療薬のデータブック	

1. 著者名 越前宏俊, 渡邊裕司	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 1-80
3. 書名 今日の治療指針2018	

1. 著者名 越前宏俊, 渡邊裕司	4. 発行年 2017年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 1-78
3. 書名 今日の治療指針 2年版 [ポケット判]	

1. 著者名 渡邊裕司	4. 発行年 2017年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 391-399
3. 書名 内科学 第11版	

〔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
研究 分 担 者	三坂 眞元  (Misaka Shingen)  (10583635)	福島県立医科大学・医学部・講師    (21601)	

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