

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06747

研究課題名(和文) HIV関連神経認知障害HANDの発症抑制を目指した抗HIV薬適正使用法の確立

研究課題名(英文) Establishment of appropriate management of anti-HIV drugs to suppress the onset of HIV-associated neurocognitive disorder (HAND)

研究代表者

津田 真弘 (Tsuda, Masahiro)

京都大学・薬学研究科・講師

研究者番号：10726813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、抗HIV薬の一種であるインテグラーゼ阻害薬の脳内移行過程における薬物排出トランスポーターの関わりを明らかにすることを目指した。ドルテグラビル、ビクテグラビルが薬物排出トランスポーターBCRPの基質となり、ラルテグラビルがBCRPによって輸送される傾向にあることを示した。マウスを用いた体内動態実験により、ドルテグラビルおよびラルテグラビルの脳内移行に対し、P-gpおよびBCRPを介した薬物輸送が関与していることを明らかにした。これらの知見はHIV感染症の精神神経系有害事象を回避するための有用な情報となると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIVによる神経毒性を原因とするHIV関連神経認知障害(HAND)は、HIV感染患者の生存率の改善に伴い問題となってきた重大な合併症である。HANDの治療や予防において抗HIV薬の脳内への移行性が重要とされている。本研究で得られた成果は、HIV治療のキードラッグであるインテグラーゼ阻害薬の脳内移行性を評価したものであり、HANDの発症抑制に有効な薬物選択法の構築に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to clarify the involvement of drug efflux transporters in the brain trafficking process of integrase inhibitors, a class of anti-HIV drugs. We showed that dolutegravir and bictegravir are transported by the drug efflux transporter BCRP, and that raltegravir tends to be transported by BCRP. Pharmacokinetic experiments in mice revealed that drug transport via P-gp and BCRP is involved in the transfer of dolutegravir and raltegravir to the brain. These findings may provide useful information for avoiding neuropsychiatric adverse events in HIV infection.

研究分野：医療薬理学、薬物動態学

キーワード：抗HIV薬 インテグラーゼ阻害薬 トランスポーター BCRP P-gp 血液脳関門 HIV関連神経認知障害 有害事象自発報告データベース

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

近年の抗 HIV 薬開発の進展は目覚ましく、従来の逆転写酵素阻害薬やプロテアーゼ阻害薬に加え、新たな作用機序のインテグラーゼ阻害薬の登場により、HIV 感染患者の生存率は非感染者とほぼ同等まで改善している (Obel et al., PloS One, 2011)。しかし、生存率の改善に伴い、HIV 感染者の高齢化とそれに伴う合併症が問題となってきている。例えば、HIV 感染や抗 HIV 薬の長期服用により、糖尿病、急性心筋梗塞、骨折、肺がん、大腸がんなどの発症リスクが増大する。中でも HIV による神経毒性を原因とする HIV 関連神経認知障害 (HIV-associated neurocognitive disorder : HAND) は、HIV 感染による重大な合併症であり、無症候性を含めると HIV 感染者のおよそ半数が認知障害を起こすと報告されている (Heaton et al., Neurology, 2010)。HAND 治療において、脳内の HIV 量を減らすことが有効とされており、抗 HIV 薬の中枢神経への移行性が重要と言われている。薬剤が中枢に移行するには血液脳関門 (blood-brain barrier : BBB) を通過しなければならず、一般的に薬剤の脂溶性が高いほど中枢移行性が高いとされ、HAND 発症抑制の面では脂溶性の高い抗 HIV 薬を選択する方法が提唱されている。しかし、BBB には異物の中枢移行を妨げる P 糖タンパク質や BCRP と言った排出型トランスポーターの発現が知られており、それらに輸送される薬物においては、脂溶性といった単一のパラメーターのみでは薬剤の中枢移行性を正確に表しているとは言えない。よって、抗 HIV 薬自体の脂溶性に加え、これら排出型トランスポーターの関与を明らかにした上で BBB の透過性を評価する必要がある。以前の研究において研究代表者は、インテグラーゼ阻害薬の一つであるドルテグラビルが BCRP によって輸送されることを *in vitro* の実験により明らかにしてきたが、*in vivo* において BCRP がドルテグラビルの体内動態にどの程度の寄与があるかは不明である。さらに、他の抗 HIV 薬も含めて同一条件でトランスポーターの関与および BBB 透過性を明らかにして比較することは、HAND の発症抑制に有効な新たな薬物選択法を構築するうえで必須の情報と言える。

## 2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、HAND 発症抑制に向けた適切な抗 HIV 薬の選択法を提案することを目指し、抗 HIV 薬の血液脳関門透過性および血液脳関門における薬物排出トランスポーターの関わりを明らかにすることを目的とする。HIV 治療のキードラッグであるインテグラーゼ阻害薬 3 種 (ドルテグラビル、ラルテグラビル、ビクテグラビル) を対象薬とし、培養細胞系を用いて、BCRP を介した輸送を評価する。さらに、動物を用いた体内薬物動態の評価、特に脳内移行の評価を行う。新たな視点として医療ビッグデータを用い、インテグラーゼ阻害薬と認知障害との関係性についても検証する。

## 3. 研究の方法

### (1) BCRP 安定発現 MDCK 細胞を用いた経細胞輸送実験

ヒト BCRP を遺伝子導入し、安定発現させたイヌ腎臓尿細管上皮細胞由来細胞株 MDCK 細胞 (MDCK /BCRP) および対照として pcDNA3.1(+)ベクターのみを遺伝子導入した MDCK 細胞 (MDCK /mock) を使用した。これらの細胞は、東京大学大学院薬学系研究科・分子薬物動態学分野から供与いただいた。MDCK /BCRP 細胞および MDCK /mock 細胞をトランズウェルに播種し、経細胞輸送実験を行った。薬物が BCRP の基質であるか否かを評価するために、見かけの透過係数である  $P_{app}$ 、下部コンパートメント (basolateral compartment, B と示す) から上部コンパートメント (apical compartment, A と示す) への透過の偏りを示す Efflux ratio、mock 細胞とトランスポーター発現細胞での Efflux ratio の比でありトランスポーターの寄与の指標となる Net ER を以下の計算式によって求めた。

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{A \times C_0} \quad \text{Efflux ratio} = \frac{P_{app \text{ BtoA}}}{P_{app \text{ AtoB}}} \quad \text{NetER} = \frac{\text{Efflux ratio of BCRP}}{\text{Efflux ratio of mock}}$$

Q : 累積透過量 A : 細胞層面積 C<sub>0</sub> : 薬物の初期濃度

### (2) ドルテグラビルおよびラルテグラビルの体内動態実験

BCRP の阻害剤としてクルクミンまたはフェブキソスタットをマウスに経口投与し、その 1 時間後にドルテグラビルを経口投与した。ドルテグラビル投与後、1, 2, 8, 24 時間後に採血を行い、血中濃度推移を評価した。次に、インテグラーゼ阻害薬の脳内移行を評価するために、P-gp・BCRP のデュアルインヒビターであるエラクリダールを経口前投与したマウスにドルテグラビル

またはラルテグラビルを静脈内投与した。投与後、一定時間後に採血を行い、遠心分離後、血漿を回収した。また、最終採血後に脳を摘出し、脳内濃度を測定した。緩衝液中濃度や血中濃度、脳内濃度を測定するためのインテグラーゼ阻害薬定量には LC/MS/MS を用いた。各サンプルに内部標準として用いるドルテグラビル-d4 を含有したアセトニトリルを用いて除タンパク処理をした後、フィルターを通したサンプルを測定した。

### (3) 有害事象自発報告データベースを用いたビッグデータ解析

アメリカ食品医薬品局 (FDA) が運営する有害事象自発報告データベース (FAERS) において、1997 年から 2018 年第 3 期の間に報告されたレコードを解析対象とした。レコードの重複や医薬品名の表記を整理した後、ICH 国際医薬品用語集 MedDRA の分類に従って HIV 関連神経認知障害、認知症、認知障害の 3 つを解析対象の有害事象とし、インテグラーゼ阻害薬の使用と上記有害事象とが関連する可能性について、reporting odds ratio (ROR) によるシグナル検出を行った。

### (4) 統計学的解析

二群間の比較はスチューデント t 検定 (両側検定) を用い、 $P < 0.05$  を統計学的に有意とした。血中濃度の比較は同一時間における二群間の比較を Bonferroni 法により行い、調整済み P 値に関して  $P < 0.05$  を統計学的に有意とした。

## 4. 研究成果

### (1) BCRP 安定発現 MDCK 細胞を用いた経細胞輸送実験

ドルテグラビル、ラルテグラビル、ピクテグラビルについて BCRP の基質となるかを明らかにするため、経細胞輸送実験を実施し、算出された  $P_{app}$ 、Efflux Ratio、Net ER を表 1 にまとめた。ドルテグラビルおよびピクテグラビルについては Net ER が 1.00 より有意に高値を示したことから BCRP の基質であることが示された。ラルテグラビルについても Net ER=1.27 (95%信頼区間: 1.00-1.55) となり、有意差こそ検出されなかったものの BCRP により輸送される傾向を示した。

表 1. 経細胞輸送実験から得られた各薬物の速度論的パラメータ

| Drug         | MDCKII-BCRP      |                  |                 | MDCKII-mock      |                  |                 | Net ER            |
|--------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|-------------------|
|              | B to A $P_{app}$ | A to B $P_{app}$ | Efflux ratio    | B to A $P_{app}$ | A to B $P_{app}$ | Efflux ratio    |                   |
| Triprolidine | 21.3<br>± 0.233  | 18.9<br>± 0.808  | 1.13<br>± 0.046 | 23.0<br>± 0.504  | 20.5<br>± 1.224  | 1.13<br>± 0.080 | 1.01<br>± 0.043   |
| Dantrolene   | 35.3<br>± 2.608  | 18.2<br>± 0.784  | 1.94<br>± 0.129 | 27.6<br>± 2.310  | 27.4<br>± 1.890  | 1.01<br>± 0.025 | 1.93*<br>± 0.136  |
| Dolutegravir | 27.9<br>± 0.382  | 19.0<br>± 1.014  | 1.48<br>± 0.073 | 24.0<br>± 0.765  | 24.1<br>± 1.018  | 1.00<br>± 0.076 | 1.48**<br>± 0.040 |
| Raltegravir  | 7.59<br>± 0.723  | 3.30<br>± 0.515  | 2.36<br>± 0.254 | 6.71<br>± 0.706  | 3.66<br>± 0.474  | 1.86<br>± 0.171 | 1.27<br>± 0.063   |
| Bictegravir  | 26.6<br>± 1.581  | 17.9<br>± 0.921  | 1.49<br>± 0.097 | 25.0<br>± 1.995  | 21.7<br>± 0.334  | 1.15<br>± 0.084 | 1.30*<br>± 0.059  |

平均値 ± 標準誤差で表記。  $P_{app}$  ( $\times 10^{-6}$  cm/s)。なおトリプロリジンは陰性対照 (BCRP の基質ではない薬物)、ダントロレンは陽性対照 (BCRP の基質である薬物) として使用。Net ER=1 との比較による t 検定を行った。  
\*\* $P < 0.01$ 、\* $P < 0.05$ 。

### (2) BCRP 阻害剤を用いたドルテグラビルの体内動態実験

ドルテグラビル経口投与時の体内動態に対する BCRP の寄与を評価するために、BCRP の阻害剤クルクミンとフェブキソスタットを用いたマウス体内動態実験を行った。クルクミンは吸収されないことから、小腸における吸収過程での BCRP の寄与の評価に使用し、フェブキソスタットは吸収過程のみならず全身における BCRP の寄与の評価に使用した。クルクミンまたはフェブキソスタット投与 1 時間後に経口投与されたドルテグラビルの血中濃度は、いずれの時点においても vehicle 群と阻害剤投与群での顕著な差は見られず、 $AUC_{0-24}$  においても阻害剤前投与による有意な影響は確認できなかったことから、ドルテグラビルの体内動態において BCRP の寄与は小さいことが示された (図 1)。

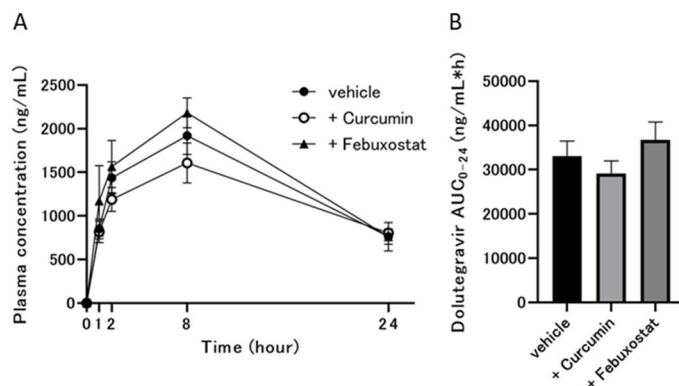


図 1. 阻害剤経口投与後のドルテグラビルの血中濃度推移 (A) と AUC の比較 (B) (平均 ± 標準誤差, vehicle; n=15, Curcumin; n=6, Febuxostat; n=6)

### (3) P-gp・BCRP デュアルインヒビターを用いたインテグラーゼ阻害薬の脳移行評価

P-gp・BCRP デュアルインヒビターであるエラクリダルを経口前投与したマウスにおける、ドルテグラビルおよびラルテグラビルの静注一定時間後の脳-血漿濃度比を検証した。エラクリダルの前投与によりドルテグラビル脳-血漿濃度比は 1.5 倍、ラルテグラビルでは 1.8 倍上昇することが示された（図 2）。また、ドルテグラビルまたはラルテグラビル投与後のエラクリダルの血中濃度も測定し、既報におけるエラクリダルの *in vitro* での P-gp もしくは BCRP に対する IC<sub>50</sub> 値を常に上回っていることを確認した。

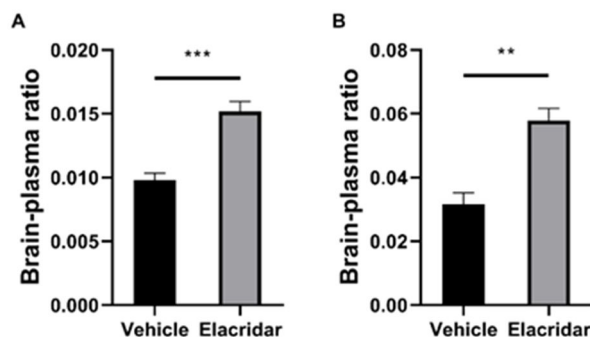


図 2. ドルテグラビル (A) およびラルテグラビル (B) の脳-血漿薬物濃度比 (平均 ± 標準誤差, n=4-6, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001)

### (4) 有害事象自発報告データベースを用いたビッグデータ解析

FAERS を用いて、インテグラーゼ阻害薬の使用の有無と認知障害の有害事象報告の関連について調べた。ドルテグラビルおよびエルビテグラビルではシグナルが検出されなかったが、ラルテグラビルではシグナルが検出され、薬剤と認知障害の間の何らかの関係性が示唆された（表 2）。

表 2. 各種インテグラーゼ阻害薬と認知障害に関する分割表

| drug         | AEs with drug (%) | AEs without drug (%)  | ROR (95% CI)     |
|--------------|-------------------|-----------------------|------------------|
| Dolutegravir | 18/6784 (0.27)    | 35826/10597518 (0.34) | 0.78 (0.70-0.88) |
| Raltegravir  | 59/10805 (0.55)   | 35785/10593497 (0.34) | 1.62 (1.56-1.67) |
| Elvitegravir | 9/3218 (0.28)     | 35835/10601084 (0.34) | 0.83 (0.67-1.03) |

以上、本研究では培養細胞系を用いた経細胞輸送実験により、インテグラーゼ阻害薬のうち、ドルテグラビル、ピクテグラビルが BCRP の基質となり、ラルテグラビルが BCRP によって輸送される傾向にあることを示した。一方でマウスを用いた体内動態実験により、ドルテグラビルの体内動態において BCRP の寄与は小さいこと、マウスにおけるドルテグラビルおよびラルテグラビルの脳移行に対し、P-gp および BCRP を介した薬物輸送が関与していることが示唆された。これらの知見はインテグラーゼ阻害薬の脳移行性についての基礎的な知見を提供するものであり、HAND の発症抑制に有効な薬物選択法の構築に有用な情報となるものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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<br>Ota Ryosaku, Ishii Hiromu, Tsuda Masahiro, Higuchi Yuriko, Yamashita Fumiyoshi   | 4. 巻<br>25                  |
| 2. 論文標題<br>A model-based comparative meta-analysis of the efficacy of dolutegravir-based and efavirenz-based regimens in HIV-infected patients   | 5. 発行年<br>2019年             |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Infection and Chemotherapy  | 6. 最初と最後の頁<br>687 ~ 694     |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.jiac.2019.03.015   | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |
| 1. 著者名<br>Chantarasrivong Chanikarn, Higuchi Yuriko, Tsuda Masahiro, Yamane Yuuki, Hashida Mitsuru, Konishi Miku, Komura Naoko, Ando Hiromune, Yamashita Fumiyoshi   | 4. 巻<br>9                   |
| 2. 論文標題<br>Sialyl LewisX mimic-decorated liposomes for anti-angiogenic everolimus delivery to E-selectin expressing endothelial cells  | 5. 発行年<br>2019年             |
| 3. 雑誌名<br>RSC Advances   | 6. 最初と最後の頁<br>20518 ~ 20527 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1039/c9ra01943j   | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |
| 1. 著者名<br>Yonezawa Atsushi, Otani Yuki, Kitano Toshiyuki, Mori Mayuko, Masui Sho, Isomoto Yui, Tsuda Masahiro, Imai Satoshi, Ikemi Yasuaki, Denda Masaya, Sato Yuki, Nakagawa Shunsaku, Omura Tomohiro, Nakagawa Takayuki, Yano Ikuko, Hayakari Makoto, Takaori-Kondo Akifumi, Matsubara Kazuo | 4. 巻<br>36                  |
| 2. 論文標題<br>Concentration and Glycoform of Rituximab in Plasma of Patients with B Cell Non-Hodgkin's Lymphoma   | 5. 発行年<br>2019年             |
| 3. 雑誌名<br>Pharmaceutical Research  | 6. 最初と最後の頁<br>82            |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1007/s11095-019-2624-5  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |
| 1. 著者名<br>Tsuda Masahiro, Otani Yuki, Yonezawa Atsushi, Masui Sho, Ikemi Yasuaki, Denda Masaya, Sato Yuki, Nakagawa Shunsaku, Omura Tomohiro, Imai Satoshi, Nakagawa Takayuki, Hayakari Makoto, Matsubara Kazuo  | 4. 巻<br>41                  |
| 2. 論文標題<br>Analysis of Glycoforms and Amino Acids in Infliximab and a Biosimilar Product Using New Method with LC/TOF-MS   | 5. 発行年<br>2018年             |
| 3. 雑誌名<br>Biological and Pharmaceutical Bulletin   | 6. 最初と最後の頁<br>1716 ~ 1721   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1248/bpb.b18-00491  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>宇野瑞樹、神谷武志、津田真弘、山下富義                       |
| 2. 発表標題<br>抗HIV薬ドルテグラビルの吸収動態に対する薬物排出トランスポーター-BCRPの寄与 |
| 3. 学会等名<br>日本薬剤学会 第35年会                              |
| 4. 発表年<br>2020年                                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>宇野瑞樹、神谷武志、津田真弘、山下富義                  |
| 2. 発表標題<br>薬物排出トランスポーター-BCRP を介したインテグラゼ阻害薬の輸送評価 |
| 3. 学会等名<br>第69回日本薬学会関西支部総会・大会                   |
| 4. 発表年<br>2019年                                 |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>麻生寛人、樋口ゆり子、津田真弘、山下富義              |
| 2. 発表標題<br>ヒアルロン酸修飾高分子ナノカプセルによる水溶性薬物のがん細胞内送達 |
| 3. 学会等名<br>第68回日本薬学会近畿支部総会・大会                |
| 4. 発表年<br>2018年                              |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                            | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-------|--|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 山下 富義<br><br>(Yamashita Fumiyoshi)<br><br>(30243041) | 京都大学・薬学研究科・教授<br><br><br><br>(14301) |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|