

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2年 5月 25日現在

機関番号：17601
研究種目：奨励研究
研究期間：2019
課題番号：19H00370
研究課題名：免疫抑制薬タクロリムスの赤血球移行を制御する因子の解明

研究代表者
吉川 直樹 (YOSHIKAWA, Naoki)
宮崎大学・医学部・薬剤師

交付決定額（研究期間全体）（直接経費）：540,000 円

研究成果の概要：

免疫抑制薬タクロリムスは、血液中においてそのほとんどが赤血球に局在する。しかしその詳細な機序は不明な部分が多い。本研究では、タクロリムスの赤血球への局在を制御する因子について検討した。

赤血球局在の制御因子として FK506 結合タンパク質 (FKBP) に着目した。ヒトより採取された血液から、赤血球を分離・培養した。培養環境を調整した赤血球に対しタクロリムスを暴露させ、培養液から赤血球への薬物移行を定量的に評価した。

検証の結果、赤血球内での FKBP との結合はタクロリムスの細胞内蓄積に関与しており、赤血球外における FKBP との結合はタクロリムスの細胞内移行を制御してい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：

本研究において、生体内でのタクロリムスの赤血球移行における FKBP の役割を一部明らかにした。本成果は、これまで不明であったタクロリムスの赤血球移行機序において、FKBP が果たす役割とその寄与率の解明に迫るものとする。本研究成果はタクロリムスの新たな体内動態制御理論の構築につながる極めて有益な知見である。

研究分野：医療薬学

キーワード：タクロリムス、赤血球、FKBP

1. 研究の目的

タクロリムスは、タクロリムス結合タンパク (FK506 binding protein: FKBP) に結合して免疫抑制作用を発揮することが知られており、FKBP には細胞質に局在する分子量 12 kDa の FKBP12 と、細胞膜に局在する分子量 13 kDa の FKBP13 が存在する。血液中におけるタクロリムスの赤血球移行性は 80%以上であることが報告されている。赤血球内の FKBP 各分子種 (FKBP12、FKBP13) の局在については明らかにされている一方、タクロリムスの赤血球移行への機序については未だ解明されていない。臨床現場においては、タクロリムスは投与後の血中濃度治療域が非常に狭く、また薬物体内動態の個人差が大きいことが知られており、適正使用の観点からも薬物血中濃度評価による治療管理は不可欠である。従って、タクロリムス血中濃度を適正レベルに維持するためには血中濃度変動の要因を適切に評価する必要があり、さらなるエビデンスの構築が必要となる。前述したタクロリムスの赤血球移行性から、赤血球数はタクロリムスの血液中存在許容量に影響を与える可能性がある。我々はこれまでに、造血幹細胞移植症例において、赤血球数変動とタクロリムス血中濃度変動が相関する症例と相関しない症例が存在するを経験してきた。しかしながら、赤血球数の変化とそれに伴うタクロリムス血中濃度変化に関する直接的な報告はなく、症例によって相関性に差が生じる原因も明確にできていないのが現状であり、緊急に対応すべき課題である。ここで、相関性に差が生じる要因の一つとして、タクロリムスの赤血球への移行・蓄積・排泄の変化がある。薬物の細胞内移行および細胞外排出にはトランスポーターが関与していることが多く、タクロリムスの赤血球移行に関してもトランスポーターの影響を受ける可能性がある。また、細胞内蓄積には特定の分子がキャリアとして貢献している可能性もある。薬物輸送能の変化により、タクロリム

スの赤血球内保持性が上昇すれば赤血球数変動とタクロリムス血中濃度変動の相関性も高くなることが想定されることから、タクロリムスの赤血球移行を左右する因子の解明は重要な課題である。解明によって得られた結果は臨床上有益な情報となり、血中濃度評価における新たな概念の確立につながる。そこで本研究では、タクロリムスの赤血球移行を制御する因子について、*in vitro* 解析を行った。

2. 研究成果

ヒトより採取された血液から、赤血球を分離・培養した。培養環境を調整した赤血球に対しタクロリムスを暴露させ、培養液から赤血球への薬物移行を定量的に評価した。赤血球局在の制御因子としてはFK506結合タンパク質(FKBP)とATP駆動トランスポーターに着目した。タクロリムスと赤血球内FKBPの結合の寄与はRapamycinによる競合阻害実験により評価し、赤血球外FKBPとの結合の寄与は培養液中のFKBP量を調整することで評価した。また、赤血球中のATP量の調整および選択的阻害剤を用いてATP駆動トランスポーターの寄与を評価した。

赤血球への曝露から2分後、培養液中のタクロリムス残存率は約30%まで低下した。Rapamycin処理により、培養液中のタクロリムス残存率は顕著に増大した。また、培養液中のFKBPの存在は、濃度依存的に培養液中のタクロリムス残存率を増大させた。さらに、タクロリムスとFKBPを予め作用させ赤血球に曝露させると、培養液中のタクロリムス残存率が増大した。

一方、2-deoxy-D-glucose存在下で培養することで赤血球中ATP量を低下させた場合、培養液中のタクロリムス残存率は変化しなかった。また、PSC-833およびMK-571処理により、赤血球のP-糖タンパク質およびMRP1を阻害した場合においても、培養液中のタクロリムス残存率は変化しなかった。

Rapamycinによる赤血球内FKBPとタクロリムスの競合的結合阻害により、タクロリムスの赤血球移行が低下したと考えられる。つまり赤血球内でのFKBPとの結合は、タクロリムスの細胞内蓄積に関与していることが示唆される。さらに、タクロリムスは赤血球外のFKBPと結合することで赤血球への移行が低下したと考えられる。従って、赤血球外におけるFKBPとの結合は、タクロリムスの細胞内移行を制御していることが示唆される。また、ATP駆動トランスポーターの寄与は小さいことが示された。

本研究において、生体内でのタクロリムスの赤血球移行におけるFKBPの役割を一部明らかにした。本研究成果はタクロリムスの新たな体内動態制御理論の構築につながる極めて有益な知見である。

3. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- ①Yoshikawa N, Urata S, Yasuda K, Sekiya H, Hirabara Y, Okumura M, Ikeda R, Retrospective analysis of the correlation between tacrolimus concentrations measured in whole blood and variations of blood cell counts in patients undergoing allogeneic haematopoietic stem cell transplantation, *Eur J Hosp Pharm*, 査読有, 27, 2020, e7-e11, doi: 10.1136/ejhpharm-2018-001663
- ②Kinoshita E, Fumoto S, Hori Y, Yoshikawa N, Miyamoto H, Sasaki H, Nakamura J, Tanaka T, Nishida K, Monitoring method for transgene expression in target tissue by blood sampling, *Biotechnol Rep (Amst)*, 査読有, 24, 2019, e00401, doi: 10.1016/j.btre.2019.e00401
- ③Furutachi M, Ota K, Fujisaki F, Ikeda R, Yoshikawa N, Yokota T, Takeda Y, Yokomizo K, Zhou JR, Kashige N, Miake F, Sumoto K, Anti-proliferative Activities of Some Bivalent Symmetrical 5-Substituted Hydantoin Derivatives towards Human Brain Glioma U251 Cells (U251) and Human Carcinoma Cells (KB3-1), *Biol Pharm Bull*, 査読有, 42, 2019, 1953-1956, doi: 10.1248/bpb.b19-00486
- ④Furutachi M, Gondo T, Ikeda R, Yoshikawa N, Yokota T, Takeda Y, Yokomizo K, Zhou JR, Kashige N, Miake F, Sumoto K, Anti-proliferative Activities towards Human Brain Glioma U251 Cells and Human Carcinoma Cells (KB3-1) of Some Twin-Drug Type Bivalent C2-Symmetrical Phenylboronic Acid Derivatives, *Biol Pharm Bull*, 査読有, 42, 2019, 833-836, doi: 10.1248/bpb.b18-00859

〔学会発表〕(計5件)

- ①吉川直樹、松尾彩子、横田翼、岩切智美、池田龍二、タクロリムスの赤血球への局在におけるFK506結合タンパク質の役割、日本薬学会第140年会、2020年
- ②吉川直樹、田崎智也、園田純一郎、畑中真理、小田康晴、松元信弘、池田龍二、MAC治療薬の併用開始が抗てんかん薬の薬物体内動態に影響を及ぼした1症例：フェニトイン血中濃度の変動、第40回日本臨床薬理学会学術総会、2019年
- ③Naoki Yoshikawa, Shuhei Urata, Kazuya Yasuda, Hiroshi Sekiya, Yasutoshi Hirabara,

Manabu Okumura, Ryuji Ikeda, Retrospective analysis of the correlation between tacrolimus whole blood concentrations and variations in blood cell counts in patients undergoing allogeneic haematopoietic stem cell transplantation、第 29 回日本医療薬学会年会、2019 年

④萩原櫻子、吉川直樹、奥村学、小倉勇樹、浦田修平、池田龍二、電子カルテシステムを基盤とした薬物血中濃度測定依頼オーダーリングの構築と評価、医療薬学フォーラム 2019/第 27 回クリニカルファーマシーシンポジウム、2019 年

⑤竹迫明子、吉川直樹、畑中真理、保田和哉、池田龍二、がん性疼痛に対し強オピオイド鎮痛薬を高用量で使用する要因の調査、第 13 回日本緩和医療薬学会年会、2019 年

4. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：池田 龍二

※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。