

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07159

研究課題名(和文) CYP3A5遺伝子情報に基づく薬物療法の個別化に関する基盤研究

研究課題名(英文) Basic research on individualized drug therapy based on CYP3A5 genetic information

研究代表者

小林 カオル (Kobayashi, Kaoru)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30255864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CYP3A5には遺伝子多型が存在し、CYP3A5欠損者が存在する。本研究では、タクロリムスを経口投与したCYP3A5欠損マウスとCYP3A5発現マウスの血中薬物濃度解析より、in vivoにおけるCYP3A5の寄与を明らかにした。さらに、CYP3A4とCYP3A5に対する7種の抗真菌薬の阻害強度の違いを示した。また、CYP3A5発現マウスへの抗真菌薬を投与により門脈中代謝物/タクロリムス濃度比が低下することを示した。以上より、CYP3A5欠損マウスとCYP3A5発現マウスが、CYP3A5の有無による薬物体内動態および代謝阻害に起因する相互作用の比較解析に有用であ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

CYP3A5欠損マウスとCYP3A5発現マウスは、全ヒトCYP3A5遺伝子が導入されており、CYP3A5遺伝子の一塩基のみが異なることからヒトのCYP3A5遺伝子多型を反映するモデルといえる。タクロリムスのインビボ代謝におけるCYP3A5の関与が検出できたこととCYP3A5発現マウスでは肝、小腸、腎臓、肺にCYP3A5が発現していることから薬効、毒性研究への発展が期待できる。また、本研究で構築した研究手法は、既存の医薬品だけでなく、開発化合物にまで応用することが可能であり、医薬品の開発の促進にも貢献できるうえ、臓器内濃度の測定など、臨床試験では実施が困難な情報を取得できる点で社会的意義も高い。

研究成果の概要(英文)：Human CYP3A5 gene shows genetic polymorphisms, and there are CYP3A5-nonexpressors and CYP3A5-expressors. The purpose of this study is to clarify the effect of CYP3A5 polymorphism on pharmacokinetics of CYP3A substrates using CYP3A5 humanized model mice. The contribution of CYP3A5 to drug metabolism in vivo was shown by different blood concentrations of tacrolimus in CYP3A5-deficient mice and CYP3A5-expressing mice after oral dosing of tacrolimus. In addition, we showed the different inhibitory effects of seven antifungal drugs on the CYP3A4 and CYP3A5 activities by using recombinant enzymes. In addition, administration of antifungal drugs to CYP3A5-expressing mice reduced the metabolite/tacrolimus concentration ratio in blood of the portal vein. These results suggest that CYP3A5-deficient mice and CYP3A5-expressing mice are useful models for comparative analysis of pharmacokinetics and drug-drug interactions depending on the presence or absence of CYP3A5.

研究分野：薬物代謝

キーワード：CYP3A5 ヒト化動物 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

Cytochrome P450 3A5 (CYP3A5)は、CYP3A4 とともに肝臓や消化管に存在し、市販薬の約 50% もの代謝に関与する重要な薬物代謝酵素である。CYP3A5 には頻度の高い遺伝子多型が存在し、CYP3A5 活性を持たない個体 (CYP3A5 欠損者)が存在する。このため、CYP3A5 欠損者では、免疫抑制薬タクロリムスの代謝が遅く、免疫抑制薬 TDM 標準化ガイドライン 2014 の中で「CYP3A5 遺伝子多型はタクロリムスの体内動態に影響を及ぼす」と記載されている。タクロリムス同様、CYP3A5 で代謝される医薬品のほとんどは CYP3A4 の基質でもある。FDA 承認薬 (2013 年~2016 年)の約 60%は CYP3A4/5 の基質であることから[]、CYP3A5 遺伝子多型が医薬品の体内動態および治療効果に影響を及ぼすかを明らかにすることは重要である。しかし、臨床研究では遺伝子多型をマスクする種々の要因により一致した結果を得ることが難しい。そこで申請者は、CYP3A5 遺伝子多型を再現できるモデル動物が、医薬品の体内動態および治療効果における CYP3A5 の寄与を予測するツールとして有用であると考えた。

2. 研究の目的

これまでに申請者らは、染色体工学技術によりヒト CYP3A 遺伝子クラスターを発現する CYP3A ヒト化マウスを開発し[]、ゲノム編集により CYP3A5 遺伝子に変異を有する CYP3A5 欠損マウスと CYP3A5 発現マウスを作成した[]。これらの CYP3A5 発現マウスと CYP3A5 欠損マウスを比較し、1) CYP3A5 の有無による CYP3A 基質のクリアランスへの影響を明らかにすることに加え、2) CYP3A5 の有無による CYP3A 阻害作用への影響を検討し、CYP3A5 の有無による薬物間相互作用への影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CYP3A5 発現マウスと CYP3A5 欠損マウスにおける CYP3A5 基質の血中濃度解析

CYP3A5 発現マウスと CYP3A5 欠損マウスにタクロリムス (3 mg/kg) を経口投与し、投与 0.25、0.5、1、2、4、7 時間後に末梢血を採取し、全血を凍結保存した。血液は、シクロスポリン (内部標準) とともに DOSIMMUNE extraction buffer (島津製作所) を用いて抽出し、Nexera LC40-XR シリーズ HPLC システムおよび LCMS8050 (島津製作所) を使用した LC-MS/MS によりタクロリムスおよび 13-O 脱メチルタクロリムスを測定した。なお、13-O 脱メチルタクロリムスは標品を入手できなかったため、検出イオンおよび保持時間を参考に、内部標準に対するイオン強度比として求めた。また、タクロリムス投与 10 分後に、門脈より採取した血液についても同様に測定した。

(2) CYP3A4 および CYP3A5 発現系ミクロソームを用いたアゾール系抗真菌薬の阻害作用比較

CYP3A4 発現系および CYP3A5 発現系 (Corning) を用いて、トリアゾラム代謝に対するアゾール系抗真菌薬 (イトラコナゾール、ポリコナゾール、ミコナゾール、ケトコナゾール、クロトリマゾール、ボサコナゾール、ラブコナゾール) の影響を調べた。トリアゾラム代謝活性は、トリアゾラムを基質とし、NADPH 存在下で発現系ミクロソームと 15 分間反応させ、HPLC-UV 法により代謝物 (1' 位水酸化体と 4 位水酸化体) 濃度を測定することにより求めた。

(3) CYP3A5 発現マウスと CYP3A5 欠損マウスにおけるアゾール系抗真菌薬の阻害作用比較

CYP3A5 発現マウスと CYP3A5 欠損マウスにアゾール系抗真菌薬 (イトラコナゾール、ポリコナゾールおよびクロトリマゾール) 各 30 mg/kg を経口投与し、30 分後にトリアゾラム (1 mg/kg) を経口投与した。トリアゾラム投与 10 分後に、門脈より血液を採取し、血漿を分離した。血漿中のトリアゾラムおよび代謝物 (1' 位水酸化体と 4 位水酸化体) 濃度は、LC-MS/MS により測定した。また、CYP3A5 発現マウスと CYP3A5 欠損マウスの小腸ミクロソームを用い、トリアゾラム代謝に及ぼすイトラコナゾール、ポリコナゾールおよびクロトリマゾールの影響を調べた。

4. 研究成果

(1) CYP3A5 発現マウスと CYP3A5 欠損マウスにおける血中タクロリムス濃度

CYP3A5 発現マウスは CYP3A5 欠損マウスよりもタクロリムスの血中濃度は低値を示し、代謝物の血中レベルは高値を示した。また、タクロリムスと代謝物の AUC 比 (代謝物/タクロリムス) を求めると、CYP3A5 発現マウスの方が CYP3A5 欠損マウスよりも有意に高値を示した (図 1)。また、タクロリムス投与後の門脈血中の代謝物/タクロリムス濃度比も CYP3A5 発現マウスの方が CYP3A5 欠損マウスよりも高値を示した。この結果より、CYP3A5 発現マウスに発現する CYP3A5 がタクロリムスの代謝に関与していることが示唆された。

(2) CYP3A4 および CYP3A5 発現系ミクロソームにおけるアゾール系抗真菌薬の CYP3A 阻害作用

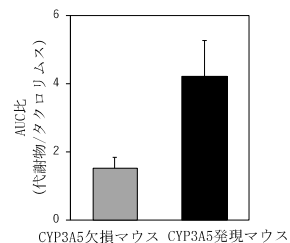


図 1 タクロリムスを投与した CYP3A5 発現マウスと CYP3A5 欠損マウスの AUC 比 (代謝物/タクロリムス)

アゾール系抗真菌薬は CYP3A4 に対する強い阻害作用が認められるため、CYP3A4 と CYP3A5 に対する阻害作用が報告されている []。しかし、実験条件が一定ではなく、コントロールされた検討は実施されていない。そこで、7 種のアゾール系抗真菌薬について、CYP3A4 および CYP3A5 発現系を用いてトリアゾラム 1' 位水酸化および 4 位水酸化への影響を検討した。表 1 に示したように、イトラコナゾール、ケトコナゾール、ラブコナゾールは、CYP3A4 に対して強い阻害作用を示した。一方、クロトリマゾールとポサコナゾールは CYP3A4 と CYP3A5 に対して同等の阻害作用を示すことが明らかとなった。ポリコナゾールとミコナゾールは 1' 位水酸化に関しては CYP3A5 に強い阻害であったが、4 位水酸化に関しては逆の結果であった。以上の結果より、アゾール系抗真菌薬は CYP3A に対する強い阻害薬と位置付けられているが、抗真菌の種類によりその強度は異なり、CYP3A4 と CYP3A5 に対する阻害も大きく異なることが明らかとなった。このことは、アゾール系抗真菌薬と CYP3A4/5 基質との薬物間相互作用を考える際、CYP3A5 遺伝子多形の影響を考慮する必要があることを示唆する。今回の検討では、トリアゾラム代謝に対する影響を解析したが、異なる基質でも解析する必要があると考えられる。

表 1 トリアゾラム 1' 位水酸化に対する K_i 値 (μM)

アゾール	CYP3A4	CYP3A5
イトラコナゾール	0.10	0.61
ポリコナゾール	7.04	2.02
ミコナゾール	0.14	0.06
ケトコナゾール	0.02	0.04
クロトリマゾール	0.02	0.01
ポサコナゾール	0.14	0.12
ラブコナゾール	0.22	3.09

(3) CYP3A5 発現マウスと CYP3A5 欠損マウスにおけるアゾール系抗真菌薬の阻害作用

発現系を用いた検討から、アゾール系抗真菌薬の種類により CYP3A4 と CYP3A5 に対する阻害強度に差異が認められたことから、CYP3A4 に対して強い阻害を示すイトラコナゾール、1' 位水酸化に関して CYP3A5 に強い阻害を示すポリコナゾール、CYP3A4 と CYP3A5 を同等に阻害するク

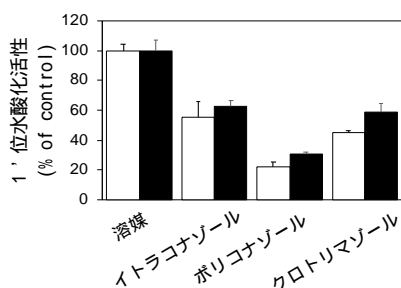


図2 CYP3A5欠損マウス(白)とCYP3A5発現マウス(黒)の小腸ミクロソームにおけるトリアゾラム1'位水酸化活性に対するアゾール系抗真菌薬の影響

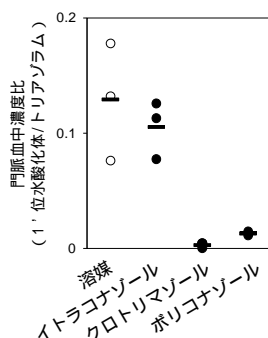


図3 トリアゾラム経口投与したCYP3A5発現マウスの門脈血中濃度比(1'位水酸化体/トリアゾラム)に対するアゾール系抗真菌薬の影響

ロトリマゾールについて、CYP3A5 発現マウスと CYP3A5 欠損マウスの小腸ミクロソームを用いてトリアゾラム代謝への影響を検討した。その結果、図 2 に示すように、いずれの抗真菌薬も CYP3A5 発現マウスと CYP3A5 欠損マウスに対して同等の阻害作用を示した。発現系を用いた検討では、CYP3A4 と CYP3A5 のいずれに対してもクロトリマゾールが最も強い阻害を示したのに対し、小腸ミクロソームを用いた検討では、イトラコナゾールと同程度の阻害であった。そこで次に、CYP3A5 発現マウスと CYP3A5 欠損マウスにアゾール系抗真菌薬を前処置しトリアゾラム経口投与後の門脈血中濃度比を求めた。図 3 に示すように、CYP3A5 発現マウス小腸 CYP3A 活性を示す

門脈血中濃度比(1'位水酸化体/トリアゾラム)は溶媒前処置群に比較して、クロトリマゾールおよびポリコナゾール前処置群で低い値を示し、アゾール系抗真菌薬によるトリアゾラム代謝阻害作用が認められた。一方、イトラコナゾールによる阻害作用は小さく、発現系を用いた検討結果と一致した。ポリコナゾールに関しては、発現系を用いた検討では阻害作用が弱いものの、マウスを用いた検討では強い阻害が認められたことから、さらなる検討が必要であると考えられた。

以上の検討より、CYP3A5 欠損マウスと CYP3A5 発現マウスを用いることにより、CYP3A 基質のクリアランスにおける CYP3A5 の寄与を明らかにできること、および CYP3A 阻害薬による薬物間相互作用の予測に応用できることが示唆された。今後、CYP3A4 と CYP3A5 の発現量比や基質ごとの CYP3A5

寄与率など、さらなる検討を行うことにより、医薬品の体内動態および治療効果における CYP3A5 の寄与を予測するツールとして活用可能になると期待される。

<引用文献>

Yu et al., Drug Metabolism and Disposition, 2018, 46, 835-845. Kazuki, Kobayashi et al., Human Molecular Genetics, 2013, 22, 578-592. Abe, Kobayashi et al., Scientific Reports, 2017, 7, 15189. Niwa et al., Current Drug Metabolism, 2014, 15, 651-679.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 峰岸 元気、香月 康宏、秋田 英万、小林 カオル
2. 発表標題 CYP3A5遺伝子多型モデルマウスにおけるin vivoタクロリムス薬物動態の解析
3. 学会等名 日本薬物動態学会第35年会
4. 発表年 2020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
研究協力者	香月 康宏 (KAZUKI Yasuhiro)		

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
---------	---------