

機関番号：32525

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590156

研究課題名(和文) 乳がん治療薬クエン酸タモキシフェンの適正使用に関する研究

研究課題名(英文) Influence of CYP2D6, CYP3A4/5 &amp; Sulfotransferase 1A1 polymorphism on the pharmacokinetics of Tamoxifen.

## 研究代表者

久保田 隆廣 (KUBOTA TAKAHIRO)

千葉科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：50323580

研究成果の概要(和文):日本人健康人由来の血小板検体を用いて、乳がん治療薬 tamoxifen の感受性の違いについて検討を行った。健康成人 101 名からの検体収集ならびに CYP2D6, CYP3A4/5, および SULT1A1 遺伝子型判定はすべて終了した。SULT1A1 遺伝子型における血小板由来蛋白質の定量および *p*-nitrophenol 代謝能等との整合性を確認した後、その結果について報告する予定である。

研究成果の概要(英文):We have studied the analysis of the mutant alleles CYP2D6, CYP3A4/5, and SULT1A1 enzymes, which are known to be present in Japanese individuals, on the metabolic activity of tamoxifen. In addition, we are comparing the relationship between *p*-nitrophenol metabolic activity and SULT1A1 genetic polymorphism using an *ex vivo* evaluation method in 101 healthy Japanese adults.

## 交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：オーダーメイド医療, 臨床薬学

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 国内外の研究動向及び位置づけ

タモキシフェン (TAM) はおもに CYP2D6 により水酸化されて活性型 endoxifen や *trans*-4-hydroxytamoxifen (OHT) となり、SULT1A1 により硫酸エステル化されて排泄される。したがって、CYP2D6 の代謝欠損型 (PM) や低活性型アリル (IM) を有している患者では TAM の効果が低く、逆に SULT1A1 の低活性型アリルを有している患者のそれは毒性が発現しやすいことが想定され、代謝/抱合過程に関わる酵素群の活性を明らかに

することの臨床的意義は大変大きい。

## (2) 着想に至った経緯

CYP2D6 や SULT1A1 の代謝/抱合活性は、これまでに Caucasian 等において個体差が存在することが報告されており、薬物の体内動態の変動により治療効果や副作用発現の差異を引き起こす可能性が示唆されている。しかし、日本人における CYP2D6 および SULT1A1 の代謝/抱合活性は Caucasian とは大きく異なることから、日本人に特徴的な変異遺伝子を捉えた検討が必要となる。これまで我々は、日本人における主要な CYP2D6

変異遺伝子を明らかにし、それらが薬物代謝活性へどのような影響を及ぼすかについて報告してきた。また最近では、日本人における *SULT1A1* による OHT 硫酸抱合活性に約 30 倍もの個人差が存在することを明らかにした。これと平行して上記酵素群の簡便・迅速な遺伝子型タイピング法も確立した。こうした成果を背景に、以下に示す代謝/抱合過程に関わる酵素群の遺伝子型タイピングや被験者血小板由来の *SULT1A1* を用いた実験等の手法を用いることで TAM の代謝/抱合活性へ及ぼす薬理遺伝的影響を検討したい。

## 2. 研究の目的

薬物代謝酵素 *CYP2D6*, *CYP3A4/5* および *SULT1A1* の遺伝的多型が、TAM の薬物体内動態にどのような影響を及ぼしているのかについて明らかにしたい。

TAM の活性型である *endoxifen* と OHT は、ともに *CYP2D6* により代謝を受けて生ずることから、*CYP2D6* の PM (*CYP2D6\*5* など) や IM (*CYP2D6\*10*) である患者においては、TAM の制がん効果が低いことが予想され、逆に *SULT1A1* の低活性型アリル (*SULT1A1\*2*) を有している患者においては、その毒性が発現しやすいことが想定される。

日本人における *CYP2D6*, *CYP3A4/5* および *SULT1A1* らの遺伝的多型により、TAM の制がん効果や骨髄抑制などの副作用発現を説明し得るとなれば、本邦において初めての報告となり、薬理遺伝情報に基づく TAM の適正使用につながるものと期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) 平成 20 年度

#### ① 研究試験計画書作成

TAM 服用患者を対象とした薬物代謝/抱合酵素に関する遺伝子解析、血小板分画、ならびに TAM とその関連代謝物濃度の測定を必要とするため、厳密な試験計画書を作成する。

#### ② 倫理審査委員会審査

被験者の募集を担当する関野臨床クリニック (研究協力施設)、および千葉科学大学において倫理審査委員会による審査を実施する。

#### ③ 各種実験項目の受入れ準備

遺伝子タイピング、薬物血中濃度分析、*SULT1A1* 蛋白定量および *SULT1A1* 活性測定 (*ex vivo*) の受入れ環境を整備する。

#### ④ TAM 服用患者の遺伝子解析用・薬物分析用検体の収集

被験者には口頭、ならびに文書にて試験計画を説明し、同意を得たうえで実施するもの

とする。遡及および追跡調査は同時期に受入れ開始とする。現在治療中である追跡調査のための検体が入手しづらい場合も考慮し、遡及調査も実施する。ただし治療の際の臨床検査データ等を入手できるもののみを対象とする。

#### ⑤ *CYP2D6*, *CYP3A4/5* および *SULT1A1* 遺伝子型タイピング

入手サンプルの遺伝子型タイピングを実施し、各種遺伝子型に応じて分類する。

### (2) 平成 21-22 年度

#### ① *CYP2D6*, *CYP3A4/5* および *SULT1A1* 遺伝子型タイピング

各種遺伝子型タイピングを行い、血小板サンプルを遺伝子型に応じて分類する。

#### ② *SULT1A1* 血小板由来蛋白質の定量

Western Blotting (*SULT1A1* 特異的抗血清) による *SULT1A1* 検出と定量を行う。各種遺伝子型間の活性を比較するため、正確に蛋白質量を補正する。

#### ③ TAM, *N*-desmethyl TAM, $\alpha$ -hydroxy TAM および OHT 濃度の比較

*CYP2D6*, *CYP3A4/5* および *SULT1A1* 遺伝子型における TAM 代謝物の測定と比較を行う。各種遺伝子型間の TAM の薬物動態に差が認められれば、薬理遺伝情報に基づく TAM の適正使用につながるものと期待できる。

## 4. 研究成果

薬物代謝/抱合酵素に関する遺伝子解析、血小板分画、ならびに TAM とその関連代謝物濃度の測定を必要とするため、厳密な試験計画書を作成した。被験者の募集を担当する関野臨床クリニック (研究協力施設)、および千葉科学大学のそれぞれにおいて倫理審査委員会による承認 (受付 No. 22-8) を得た後、下記 (1)~(5) の検討を行った。

被験者には口頭、ならびに文書にて試験計画を説明し、同意を得たうえで実施した。現在治療中である追跡調査のための検体が入手しづらい場合も考慮し、遡及調査も実施した。ただし、治療の際の臨床検査データ等を入手できるもののみを対象とした。

### (1) 遺伝子タイピング (Genotyping)

薬物代謝および抱合酵素に関する遺伝子解析系を確立した。前者は、*CYP2D6* (*\*5*, *\*10*, *\*14*, *\*21*, *\*36* など)、*CYP3A4/5* (*CYP3A4\*18* など) を、後者は *SULT1A1* (*SULT1A1\*2* など) に関するヒトにおける遺伝的多型を対象とした (未知変異を除く)。

各種遺伝子型タイピングを行い、入手した血小板検体を遺伝子型に応じて分類した。

(2) 薬物血中濃度分析 (Phenotyping)

TAM とその代謝物である *N*-desmethyl TAM,  $\alpha$ -hydroxy TAM および OHT 濃度の比較を行うべく、高速液体クロマトグラフィーによる定量測定系を確立した。

(3) SUL1A1 蛋白定量 (Western Blotting)

Western Blotting (SUL1A1 特異的抗血清) による SUL1A1 検出と定量系を確立した。

現在、各種遺伝子型間の活性を補正するために蛋白質量の定量を継続中である。

(4) SUL1A1 活性測定 (*ex vivo*)

SUL1A1 代謝活性測定を *ex vivo* にて評価すべく、各種遺伝子型間における *p*-nitrophenol を用いた代謝活性測定系を確立した。

現在、各種遺伝子型間の活性を比較するため、入手した血小板検体を用いて計測中である。

(5) CYP2D6, CYP3A4/5 および SUL1A1 新規変異探索

Genotype (1) と Phenotype (2 または 4) の整合性が認められない検体に関しては、新規変異を確認すべく、CYP2D6, CYP3A4/5 および SUL1A1 に関する sequencing 解析を行っている。

開始当初、倫理審査委員会による厳密な審査を受けて「研究試験計画書」において取り上げた被験者の分類に一部修正を要請された。すなわち、TAM 服用患者にてとり行う以前に、まずは健常人の血小板検体を用いて TAM 感受性を評価するよう求められた。これを受けて、日本人健常成人 101 名からの検体収集を終え、*p*-nitrophenol を用いた代謝活性測定系等、各種実験項目を追加することとなった。

CYP2D6, CYP3A4/5 および SUL1A1 遺伝子型における *p*-nitrophenol (PNP) を用いた代謝活性測定を比較した結果、各種遺伝子型間における PNP の薬物動態に差が認められれば、薬理遺伝情報に基づく TAM の適正使用につながるものと期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Kimura S, Hasegawa S, Kobayashi A, Yamaguchi H, Yohda M, Kubota T. Novel CYP2C19 629c>a mutant gene detection in

Japanese subjects and estimation of its effect on conformation. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 査読有, **4**: 412-417 (2010)

- ② Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Arai O, Watanabe F, Abe J, Maruyama Y, Oohata A, Ikeya K, Kageoka M, Miwa I, Satou Y, Hosoda Y, Kubota T. Thiopurine maintenance therapy for ulcerative colitis - the clinical significance of monitoring 6-thioguanine nucleotide. *Inflamm Bowel Dis*, 査読有, **16**: 1376-1381 (2010)
- ③ 久保田隆麿、吉岡慎一、川越信秀、豊田剛史、石橋範人、鈴木信孝、新規サブリメントと医薬品の相互作用を予見する、*日本補完代替医療学会誌*, 査読有, **7**: 67-74 (2010)
- ④ Uchiyama K, Nakamura M, Kubota T, Yamane T, Fujise K, Tajiri H. Thiopurine S-methyltransferase and inosine triphosphate pyrophosphohydrolase genes in Japanese patients with inflammatory bowel disease in whom adverse drug reactions were induced by azathioprine/6-mercaptopurine treatment. *J Gastroenterology*, 査読有, **44**: 197-203 (2009)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 内山幹ら、チオプリン製剤不耐の日本人炎症性腸疾患患者における Thiopurine S-methyltransferase および Inosine triphosphate pyrophosphohydrolase 遺伝子の検討、第 95 回日本消化器病学会総会、5 月 8 日 (2009), 札幌。
- ② K. Uchiyama *et al* Adverse reactions of azathioprine / 6-mercaptopurine treatment, thiopurine S-methyltransferase and inosine triphosphate pyrophosphohydrolase genes in Japanese patients with inflammatory bowel disease. DDW (AGA), May 31 (2009), Chicago, USA.
- ③ T. Kubota, *et al*. Thiopurine S-methyltransferase and inosine triphosphate pyrophosphohydrolase genes in Japanese patients with inflammatory bowel disease in whom adverse drug reactions were induced by azathioprine/6-mercaptopurine treatment. *EHRlich II, 2nd World Conference*. October -5 (2008), Nürnberg, Germany.

[図書] (計1件)

- ① 久保田隆廣, 菅谷誠, 坂本新子, 医薬ジャーナル社, 確認テストと症例解析で身につける 薬物速度論入門、2010、71

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久保田 隆廣 (KUBOTA TAKAHIRO)

千葉科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：50323580