

平成 22年 4月 8日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890250

研究課題名（和文）薬力学的解析を用いたテララーメイド免疫抑制療法の確立

研究課題名（英文）The pharmacodynamic analysis of immunosuppressive agents using T-cell proliferation assay

研究代表者

倉田 洋子（KURATA YOKO）

金城学院大学・薬学部・助教

研究者番号：80513928

研究成果の概要（和文）：健常成人および32名の生体腎移植患者の血液を用いて、蛍光色素 CFSE (carboxylfluorescein diacetate succinimidyl ester) 染色 T リンパ球の増殖により免疫抑制薬の効果をフローサイトメトリー (flow cytometry; FCM) により解析する CFSE-FCM 法を開発した。これにより、シクロスポリン (cyclosporine; CSA)、タクロリムス (tacrolimus; TAC) およびプレドニゾロン (prednisolone; PRD) の効果の個人差は大きい、ミコフェノールモフェチル (mycophenolic acid; MPA) の個人差はほとんどないことが明らかとなった。また、CSA 高感受性群では、感染症の発生率が有意に高かった。これにより、移植後の血中濃度モニタリングのみでなく、移植前に CFSE-FCM 法を用いた薬物感受性試験を施行することで、予め最適な薬剤の量および種類の選択および移植後の臨床事象の発症の予測が可能となるものと示唆された。つまり個々の患者の正確で客観的な情報に基づいた安全で効果的な免疫抑制療法の施行が可能となる。

研究成果の概要（英文）：The impact of pretransplant T-cell sensitivity testing using carboxylfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)-based flow cytometry was studied in 32 patients with chronic renal failure. There was considerable interindividual variation in the inhibitory effects of cyclosporine (CSA), tacrolimus (TAC), and prednisolone (PRD) but only a small amount of interindividual variation for mycophenolic acid (MPA). Patients with high sensitivity to CSA tended to experience viral reactivation. In addition to post-transplant blood-level monitoring, pretransplant pharmacodynamics could provide useful information on optimal and safe immunosuppressive therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,080,000	324,000	1,404,000
2009年度	960,000	288,000	1,248,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

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：テララーメイド、免疫抑制薬、薬力学的解析、T リンパ球

1. 研究開始当初の背景

近年、医療業界では、「テーラーメイド医療」に注目が集まっている。現在主流となっている「レディーメイド医療」では、同じ症状を訴える患者には、決まった薬を一定量投与するため、効果があらわれずに何度も薬剤や投与量を変更したり、予期しない重篤な副作用が発生してしまう場合があり問題となっている。さらに、症状がある患者全てに（効果がない患者にも）投与するため、薬剤費は増える一方である。「テーラーメイド医療」とは、患者の体質や病状などを考慮して、患者一人ひとりに最適な治療法を提供する医療をいう。予め個人の体質の違いを解析し、年齢、性別、体重、腎機能などを考慮した薬物投与設定を行うため、治療効果は高まり、副作用は軽減する。無駄な薬剤の投与が減少するため、医療費の抑制にも繋がる。すでにテーラーメイド医療に関する研究も政府や大学などの研究機関を中心に進められており、本格的な普及が強く望まれている。現在、臓器移植後の免疫抑制療法ではカルシニューリン阻害薬、代謝拮抗薬、ステロイド薬などの免疫抑制薬が広く使用されている。シクロスポリン、タクロリムスなどカルシニューリン阻害薬を中心に血中濃度（薬物動態学; pharmacokinetics; PK）モニタリングによる投与量の調節が行われているが、患者個々で免疫抑制薬に対する感受性に個人差があるため、免疫抑制効果が不十分で拒絶反応が生じたり、逆に過剰な免疫抑制効果により感染症が惹起したりする場合があります。つまり、移植領域においても、薬物の効果を考慮して個々の患者の最適な薬剤を使用するテーラーメイド医療の実践が強く望まれている。今回我々は、現在行われている PK ではなく、免疫抑制薬の薬力学（pharmacodynamics; PD）解析法の開発を試み、PD 解析法を用いたテーラーメイド免疫抑制療法の実践を目指す。

2. 研究の目的

現在、臓器移植後の免疫抑制療法ではカルシニューリン阻害薬、代謝拮抗薬、ステロイド薬などの免疫抑制薬が広く使用されている。シクロスポリンおよびタクロリムスなどのカルシニューリン阻害薬は、免疫抑制効果が非常に強力であり、現在の免疫抑制療法において欠かすことのできない薬剤である。しかし、腎障害、糖尿・高血糖、血圧上昇などの様々な副作用が報告されており、投与を慎重に行わなければならない薬剤でもある。現在、血中濃度のモニタリングにより投与量の

調節が行われているが、免疫抑制効果が不十分のため拒絶反応が生じたり、逆に過剰な免疫抑制効果によって感染症が惹起したりする場合があります。従って、pharmacokinetics (PK) モニタリングのみではなく、薬物血中濃度の推移に対する薬効の変化を観察する pharmacodynamics (PD) モニタリングの重要性が指摘されている。しかし、手技の煩雑さ、精度の問題から臨床応用はされていない。一方、その他の免疫抑制薬においては、一部の施設では血中濃度のモニタリングが行われているが、特定薬剤治療管理料として診療報酬が適用されていないなどの理由から、PK モニタリングは普及していない。従って、画一的に体重当たりで算出された用量が投与されるため、投与後に副作用が発現した場合、投与量が調節されているのが現状である。本研究において我々は、より迅速に、より簡便に、より安価で、なおかつ再現性の高い結果が得られる免疫抑制薬の PD 解析方法の開発し、臨床応用を試みる。

3. 研究の方法

健常成人から末梢血を採取した後、Histopaque-1077 (Sigma) を用いた Ficoll-Conray 法によりリンパ球を分離する。リンパ球細胞液は、リンパ球細胞の含有濃度が 2.0×10^6 個/mL になるように培養液で調整する。5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester¹⁻³⁾ (CFSE; invitrogen) により、リンパ球を染色する。HEPES Buffer solution (Sigma) の含有濃度が 1% となるように AIM V medium (GIBCO) に加えて、培養液を調整する。96 穴プレートにそれぞれ 100 μ L のリンパ球細胞液を加えた後、各免疫抑制薬（シクロスポリン、タクロリムス、ミコフェノール酸モフェチルなど）含有液 50 μ L を添加し、37 $^{\circ}$ C で 30 分間培養する。その後、刺激薬 phytohemagglutinin (PHA; Sigma; 1.25 μ g/ml) もしくはヒトのリンパ球細胞含有液 50 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で培養する。培養後の各免疫抑制薬の細胞増殖抑制効果は、以下の (1) ~ (3) の方法にて解析する。

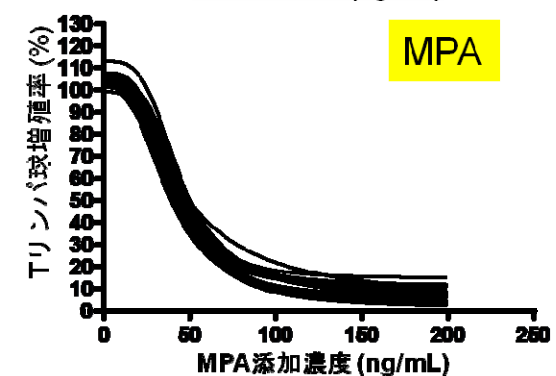
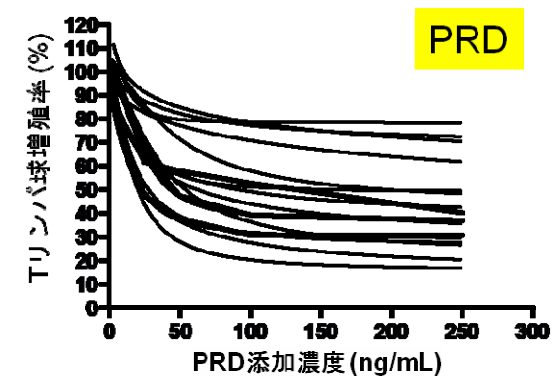
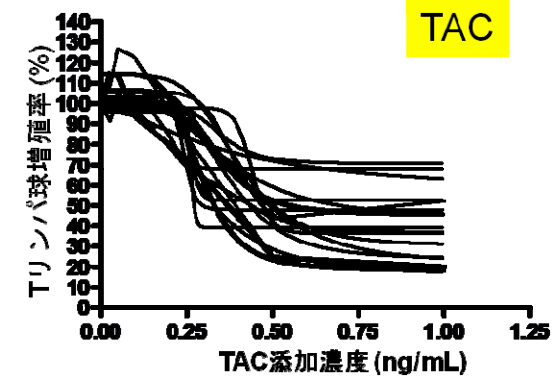
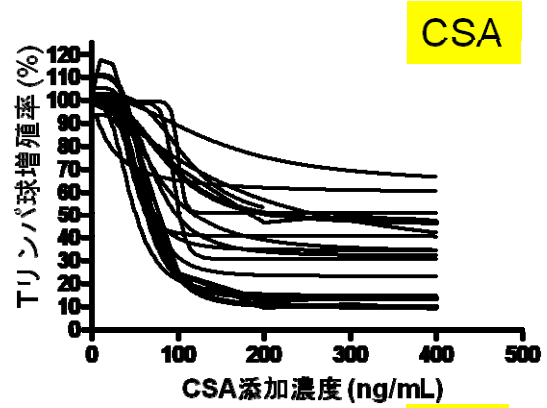
- (1) 刺激薬を添加した後、2~6 時間培養したリンパ球において、各種サイトカイン (IL2, IL4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , TGF- β 1) の mRNA を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) にて測定する。
- (2) 刺激薬を添加した後、24 時間培養したリンパ球において、proliferating cell nuclear antigen (PCNA) mRNA 量を RT-PCR にて測定する。
- (3) 刺激薬を添加した後、72 時間培養したり

ンパ球において、CFSEの蛍光を用いて細胞増殖をflow cytometry (FCM)にて測定する。健常成人でそれぞれのPD解析の再現性、精度を評価し、最良の方法を確立した後、患者検体を用い臨床応用の可能性を検討する。

4. 研究成果

(3)では、CSA、TAC、PRDおよびMPAは、濃度依存的にTリンパ球の増殖を抑制し、シグモイド曲線からIC50値(50% inhibitory concentration)が算出できた。CSA、TACおよびPRDのIC50値およびTリンパ球最小増殖率(以降最小増殖率と表示する)は患者間で大きく異なっていたが、MPAのそれらは患者間で類似していた。また、移植後3ヶ月までの導入期におけるCMV(cytomegalovirus)またはVZV(varicella zoster virus)感染(再活性化)とIC50値および最小増殖率との関連性をみたところ、CSAおよびTACにおいては最小増殖率が30%以下の高感受性患者において感染症の発症が高い傾向が認められ、PRDにおいてはIC50値が平均IC50値よりも低い高感受性患者において感染症の発症が高い傾向が認められた。(2)では、MPAは濃度依存的にPCNA mRNAの発現を抑制し、得られたシグモイド曲線は患者間で異なっていた。(1)では、CSA、TACおよびPRDは濃度依存的にIL-2 mRNAの発現を抑制し、CSAおよびTACにおいては、患者間でシグモイド曲線は類似していたが、PRDのそれらは、患者間で異なっていた。(1)および(2)で測定したIC50値および最小増殖率とCMV・VZV感染との関連は認められなかった。

以上の結果より、CSA、TACおよびPRDにおいては、(1)のIL-2 mRNA量を指標にすることが本来の作用機序を反映するものであるが、IL-2 mRNA抑制(IC50値および最小増殖率)の個人差と導入期の臨床事象(感染症)との関連は認められなかった。その理由として、導入期で調節されるCSAおよびTACの目標濃度が、IL-2 mRNAのIC50値を大きく上回るためであると考えられた。一方、(3)にてTリンパ球数を指標にしたところ、大きな個人差が認められ、免疫抑制薬に対する感受性の高い患者においてCMV・VZV感染を惹起する確率が高かった。この結果より、予めTリンパ球数を測定することで、導入期のCMV・VZV感染のリスクを予測できる可能性が考えられた。一方、MPAはその作用機序から推測されるように(1)で測定したIL-2 mRNAの発現を抑制しなかったが、(3)では明らかなTリンパ球増殖抑制が認められた。しかし、個人差は認められず、すべての患者において類似した濃度と、薬効のシグモイド曲線が得られた。この結果より、MPAは個々におけるPDに顕著な差はなくPDモニタリングの必要性は少ないものと考えられた。ま



た、(2)のPCNA mRNAは、すべての薬剤で個人差が認められ、その抑制効果は(3)のTリンパ球の増殖抑制と同様な傾向を示したことから、迅速なPD解析法として移植後の免疫機能モニタリングに用いられる可能性が示唆された。

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2件)

① Kurata Y, Kato M, Kuzuya T, Miwa Y, Iwasaki K, Haneda M, Amioka K, Watarai Y, Uchida K, Nakao A, Kobayashi T, Pretransplant pharmacodynamic analysis of immunosuppressive agents using CFSE-based T-cell proliferation assay, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 査読有, 86(3), 2009, 285-289

② 倉田 洋子, 加藤 真梨奈, 葛谷 孝文, 羽根田 正隆, 野田 幸裕, 長坂 隆治, 中尾 昭公, 打田 和治, 岩崎 研太, 小林 孝彰, 網岡 克雄, 免疫抑制薬の分子論的解析と臨床応用可能な PD モニタリングの開発, 今日の新移植, 査読無, 21 巻 6 号, 2008, 602-604

[学会発表] (計11件)

① 加藤 真梨奈, 倉田 洋子, 葛谷 孝文, 羽根田 正隆, 岩崎 研太, 野田 幸裕, 小林 孝彰, B 細胞を用いた免疫抑制薬の薬力学的解析 シクロスポリンは B 細胞を抑制するか?, 第 4 5 回日本移植学会総会 (東京), 2009 年 9 月 18 日

② 加藤 真梨奈, 倉田 洋子, 葛谷 孝文, 羽根田 正隆, 岩崎 研太, 野田 幸裕, 小林 孝彰, リンパ球を用いた免疫抑制薬の PD 解析方法の確立, 第 1 3 0 回日本薬学会東海支部大会 (名古屋), 2009 年 7 月 11 日

③ 倉田 洋子, 加藤 真梨奈, 葛谷 孝文, 岩崎 研太, 羽根田 正隆, 打田 和治, 中尾 昭公, 小林 孝彰, 網岡 克雄, 免疫抑制療法における T cell proliferation を指標とした PD assay の有用性, 第 1 2 9 回日本薬学会年会 (京都), 2009 年 3 月 26 日

④ 葛谷 孝文, 加藤 真梨奈, 倉田 洋子, 片山 昭男, 打田 和治, 丹羽 操, 三輪 祐子, 岩崎 研太, 羽根田 正隆, 小林 孝彰, 腎移植患者を対象とした免疫抑制薬の薬力学的解析, 第 4 2 回日本臨床腎移植学会総会 (千葉), 2009 年 1 月 28 日

⑤ 葛谷 孝文, 加藤 真梨奈, 倉田 洋子, 片山 昭男, 打田 和治, 丹羽 操, 三輪 祐子, 岩崎 研太, 羽根田 正隆, 小林 孝彰, 免疫抑制療法最先端 腎移植後の免疫抑制療法個別化プロジェクト, 第 3 5 回日本臓器保存生物医学学会総会 (東京), 2008 年 11 月 23 日

⑥ 倉田 洋子, 加藤 真梨奈, 葛谷 孝文, 中尾 昭公, 打田 和治, 小林 孝彰, 網岡 克雄, Cell proliferation を指標とした PD assay の開発, 第 4 4 回日本移植学会 (大阪), 2008 年 9 月 20 日

⑦ 加藤 真梨奈, 倉田 洋子, 葛谷 孝文, 打田

和治, 野田 幸裕, 小林 孝彰, 免疫抑制薬の薬力学的モニタリングの開発とその有用性の検討, 第 4 4 回日本移植学会 (大阪), 2008 年 9 月 21 日

⑧ 水谷 加代子, 倉田 洋子, 加藤 真梨奈, 葛谷 孝文, 野田 幸裕, 小林 孝彰, Pharmacodynamics (PD) を用いた代謝拮抗薬の薬効評価と個人差の解析, 第 4 4 回日本移植学会 (大阪), 2008 年 9 月 21 日

⑨ 岩瀬 勇人, 小林 孝彰, 中尾 昭公, 片山 昭男, 三輪 祐子, 丹羽 操, 岩崎 研太, 羽根田 正隆, 葛谷 孝文, 櫛原 秀之, 倉田 洋子, 加藤 真梨奈, 水谷 加代子, 打田 和治, 長坂 隆治, 移植における Foxp3 発現の変化, 第 4 4 回日本移植学会 (大阪), 2008 年 9 月 21 日

⑩ 倉田 洋子, 加藤 真梨奈, 葛谷 孝文, 野田 幸裕, 羽根田 正隆, 長坂 隆治, 中尾 昭公, 打田 和治, 片山 昭男, 小林 孝彰, 網岡 克雄, 免疫抑制薬の薬力学的モニタリング法の確立, 第 2 5 回日本 TDM 学会・学術大会 (東京), 2009 年 6 月 22 日

⑪ 加藤 真梨奈, 倉田 洋子, 葛谷 孝文, 野田 幸裕, 羽根田 正隆, 長坂 隆治, 中尾 昭公, 打田 和治, 片山 昭男, 網岡 克雄, 小林 孝彰, リアルタイム RT-PCR を用いた免疫抑制薬の薬力学的モニタリング, 第 2 5 回日本 TDM 学会・学術大会 (東京), 2009 年 6 月 22 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉田 洋子 (KURATA YOKO)

金城学院大学・薬学部・助教

研究者番号: 80513928