

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07063

研究課題名(和文)メトトレキサートによる臓器障害を規定する薬物動態制御因子の薬理遺伝学的解析

研究課題名(英文) Pharmacogenetic analysis of pharmacokinetic factors related with methotrexate-induced toxicity

研究代表者

鳴海 克哉 (Narumi, Katsuya)

北海道大学・薬学研究院・講師

研究者番号：90746752

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、メトトレキサート(MTX)による肝障害の個体差に焦点をあてその要因を明らかにするべく検討を行った。HepG2細胞を用いた検討において、MTX誘発性肝障害はアルデヒドオキシダーゼ(AOX)の機能低下により増強することが示唆された。また、AOX1遺伝子のSNP解析により東アジア人に多いT755I変異がAOXの酵素活性を顕著に低下させることが明らかとなった。有害事象自発報告データベースFAERSを用いた解析によりAOX阻害作用を有する薬剤の併用がMTXによる肝障害の発生頻度を上昇させることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓においてMTXはAOXを介してより毒性の低い7-OH-MTXに代謝されることが知られている。本研究の結果から、先天的にAOX活性が低い患者やAOX阻害作用を有する薬剤を併用している患者では、MTXの代謝が低下し肝毒性が増強する可能性が示された。MTXは比較的安価な薬剤であり、その汎用性を考慮すると、MTXの適正使用を指向した本研究の社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on individual differences in MTX-induced hepatic injury and investigated to clarify its mechanism. MTX-induced hepatotoxicity was enhanced by inhibition of aldehyde oxidase (AOX) activity in HepG2 cells. In addition, SNP analysis of AOX1 gene revealed that the T755I variant, found in East Asian populations, markedly decreased the enzymatic activity of AOX. The analysis based on the FAERS database revealed that concomitant use of drugs with AOX inhibitory activity increased the incidence of MTX-related hepatotoxicity.

研究分野：薬物動態学

キーワード：メトトレキサート アルデヒドオキシダーゼ 一塩基多型 肝障害

1. 研究開始当初の背景

メトトレキサート (MTX) はリウマチや造血器腫瘍のキードラッグであり、代表的な副作用の1つに肝障害が知られている。MTXの副作用を回避するために投与後の血中MTX濃度測定が臨床上有用である一方で、用量依存性の副作用の中でも特に肝障害や消化器症状は発現頻度も高く、毒性の発現に個人差も存在するため投与後の血中濃度測定のみで副作用の発症/重篤化は防げないのが現状である。このことからMTXの体内動態あるいは毒性発現の個人差に関しては、なんらかの遺伝的要因が関わっていることが推察される。したがって、MTXの毒性発現の個人差をもたらす遺伝的要因を明らかにし、肝障害を予測するエビデンスを構築することによりMTXの副作用回避を指向した個別化療法への応用が可能になると考えられる。

アルデヒドオキシダーゼ (AOX) は、肝臓においてMTXを7-OH-MTXへ不可逆的にヒドロキシ化する代謝酵素であるが、その活性には個人差が存在することが知られている¹。しかしながら、MTX自体は腎排泄型薬剤であることから薬物動態学的に肝臓における代謝に関してはほとんど注目されていなかった。近年、医薬品開発段階におけるAOX活性の重要性が明らかとなり、その活性を阻害する医薬品も見出されているが、AOX活性の差が基質薬の臨床反応性に及ぼす影響は不明である²。

2. 研究の目的

本研究では、MTXによる肝障害の個人差に着目し、その毒性発現機序の一つとしてAOXを含めた薬物動態制御因子の複合的な関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MTX誘発性肝障害における薬物動態制御因子の関与

ヒト肝癌由来細胞株であるHepG2細胞を用いて、各薬剤が細胞生存率へ及ぼす影響をMTTアッセイにて評価した。また、siRNAを用いてAOX1をノックダウンしたHepG2細胞を用いて同様に評価を行った。なお、AOX1発現量はリアルタイムPCRおよびウエスタンブロットイングにて確認した。

(2) AOX1遺伝子のSNP解析

gnomADおよび1000 genomes projectより、AOX1のSNPs (アレル頻度 > 1%) を抽出した。各変異体AOX1発現HEK293T細胞を作製し、AOX1の典型基質であるフタラジンの酸化能を評価した。なお、代謝物であるフタラゾンの定量にはLC-MS/MSを用いた。また、AOX1の機能に重要とされる二量体形成能はNative-PAGE法により評価した。

(3) 医薬品有害事象自発報告データベースを用いたMTXの副作用発現解析

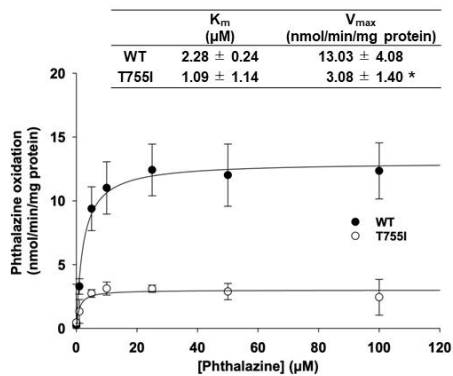
FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) を用いて、MTXとAOX阻害薬の併用および非併用症例の報告オッズ比 (ROR) および95%信頼区間 (CI) を算出し、阻害薬を併用した際の肝障害発現頻度の変化を定量化した。

4. 研究成果

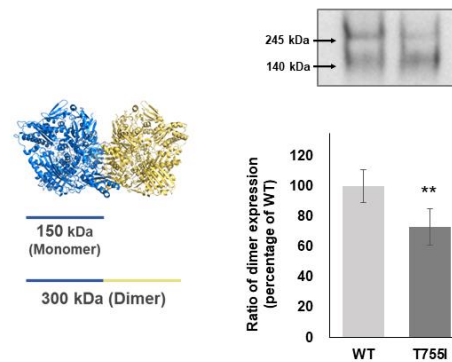
(1) 肝臓においてMTX動態に寄与する multidrug resistance associated proteins (MRPs)、breast cancer resistance protein (BCRP) および AOX に着目し、これらの阻害剤および siRNA を用いて MTX の肝毒性に対する影響を評価した。MRP 阻害剤 (MK571) および BCRP 阻害剤 (Ko143) は MTX による細胞生存率の低下に対して有意な影響を及ぼさなかった。一方、AOX 阻害剤であるラロキシフェンにより、MTX による細胞生存率の低下が増強する傾向を示した。また、AOX1 ノックダウン条件下において MTX による細胞生存率の低下が増強することが示された。肝臓において MTX は AOX を介してより毒性の低い 7-OH-MTX に代謝されることが知られている。以上の結果から、MTX 誘発性肝障害は AOX の機能低下により増強される可能性が示された。

(2) 6つの coding SNPs について、AOX 基質であるフタラジンの酸化能を評価したところ、野生型 (WT) AOX1 と比較して T755I 変異体では、Michaelis 定数 (K_m) が不変であった一方で、最大反応速度 (V_{max}) が顕著に減少した (図 1A)。また T755I 変異により、AOX1 の二量体形成量が減少することが明らかとなった (図 1B)。以上より、T755I は基質結合部位の構造を変化させずに、二量体形成不全による代謝速度の減少を引き起こすことが示唆された³。

(A)



(B)



T755I変異がAOXの酵素活性 (A) およびダイマー形成 (B) に及ぼす影響

(3) AOX 阻害作用を有する薬剤を対象とし MTX 誘発性肝障害の発現頻度の変化を評価したところ、実臨床における血中濃度で AOX 活性を阻害し得る複数の薬剤について、併用による ROR の増加 (かつ 95%CI の重複なし) が示された。以上より、AOX の阻害が MTX 誘発性肝障害の発現頻度を上昇させる可能性が示された。

AOX を介した薬物間相互作用に関する臨床報告は限られており、本研究で見出した SNP の臨床的インパクトも現状推測の域を出ない。したがって、薬物療法における AOX の薬物動態学的重要性を明確にするため今後さらなる検証が必要である。

<引用文献>

- (1) Fu C, Di L, Han X, Soderstrom C, Snyder M, Troutman MD, Obach RS, Zhang H. Aldehyde oxidase 1 (AOX1) in human liver cytosols: quantitative characterization of AOX1 expression level and activity relationship. *Drug Metab Dispos.* 41(10): 1797-1804. (2013)
- (2) Obach RS, Huynh P, Allen MC, Beedham C. Human liver aldehyde oxidase: inhibition by 239 drugs. *J Clin Pharmacol.* 44(1): 7-19. (2004)
- (3) Ueda H, Narumi K, Furugen A, Saito Y, Kobayashi M. The rs35217482 (T755I) single-nucleotide polymorphism in aldehyde oxidase-1 attenuates protein dimer formation and reduces the rates of phthalazine metabolism. *Drug Metab Dispos.* 50 (9): 1126-1131. (2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Ueda Hinata, Narumi Katsuya, Sato Yu, Furugen Ayako, Kobayashi Masaki, Iseki Ken | 4. 巻 72 |
| 2. 論文標題 Evaluation of possible pharmacokinetic interaction between methotrexate and proton pump inhibitors in rats | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Pharmacological Reports | 6. 最初と最後の頁 1426 ~ 1432 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s43440-020-00130-1 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Ueda Hinata, Narumi Katsuya, Furugen Ayako, Saito Yoshitaka, Kobayashi Masaki | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 The rs35217482 (T755I) Single-Nucleotide Polymorphism in Aldehyde Oxidase-1 Attenuates Protein Dimer Formation and Reduces the Rates of Phthalazine Metabolism | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Drug Metabolism and Disposition | 6. 最初と最後の頁 1126 ~ 1131 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/dmd.122.000902 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 鳴海克哉、上田一奈太、佐藤優、古堅彩子、井関健、小林正紀 |
| 2. 発表標題 メトトレキサートとプロトンポンプ阻害剤間の薬物相互作用に関する後方視的評価およびその相互作用機序の解析 |
| 3. 学会等名 第31回日本医療薬学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 上田一奈太、鳴海克哉、古堅彩子、小林正紀、井関健 |
| 2. 発表標題 メトトレキサート投与時におけるプロトンポンプ阻害剤のin vivoおよびin vitro薬物相互作用評価 |
| 3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第147回例会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 上田 一奈太、鳴海 克哉、古堅 彩子、小林 正紀 |
| 2. 発表標題 AOX1遺伝子のT755I多型は二量体形成および代謝活性を低下させる |
| 3. 学会等名 日本医療薬学会 第5回フレッシュャーズ・カンファランス |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森山綾子、鳴海克哉、上田一奈太、古堅彩子、小林正紀 |
| 2. 発表標題 メトトレキサート誘発性肝障害におけるaldehyde oxidase 1の関与 |
| 3. 学会等名 第35回北海道薬物作用談話会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Katsuya Narumi |
| 2. 発表標題 Clinical importance of drug interaction between methotrexate and proton pump inhibitors and its potential mechanism |
| 3. 学会等名 The 7th Japan-Taiwan Joint Symposium For Pharmaceutical Sciences (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hinata Ueda, Katsuya Narumi, Ayako Furugen, Masaki Kobayashi |
| 2. 発表標題 Effect of aldehyde oxidase inhibitors on azathioprine-induced hematologic and hepatic injury |
| 3. 学会等名 日本薬学会第143年会 (PSJ/CSPS ジョイントシンポジウム) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学 大学院薬学研究院 臨床薬剤学研究室 ホームページ
<https://rinshoyakuzaigaku.pharm.hokudai.ac.jp/>

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

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