

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790145

研究課題名(和文) 抗がん剤の血液毒性を決定付ける薬物トランスポーターの役割

研究課題名(英文) Role of drug transporters in the anticancer drug-induced hematotoxicity

研究代表者

前田 和哉 (MAEDA KAZUYA)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：00345258

研究成果の概要(和文)：臨床報告で明らかになった OATP1B3, MRP2 の遺伝子多型が docetaxel の血液毒性リスクを決定するというメカニズムを *in vitro* 試験から実証した。Docetaxel は、OATP1B3 によって主に肝取り込みされることを明らかにするとともに、血液細胞もしくはその前駆細胞に発現する MRP2 による排出機能の低下が、血球毒性につながる可能性を示唆する結果を得た。さらにこれら機能低下を組み入れた数理モデルを構築し、OATP1B3, MRP2 の機能変動が血液毒性のリスク変動に与える影響について考察した。

研究成果の概要(英文)：Based on the recent report demonstrating the relationship between genetic polymorphisms of OATP1B3 and MRP2 and risk of neutropenia induced by docetaxel, I clarified this mechanisms by *in vitro* experiments. I showed that docetaxel was taken up into human hepatocytes mainly by OATP1B3 and that the decreased function of MRP2 in hematopoietic cells or their precursor cells lead to the increased risk of hematotoxicity. I also constructed a mathematical model describing pharmacokinetics of docetaxel and subsequent effect on the decrease of hematopoietic cells and quantitatively evaluated the impact of OATP1B3 and MRP2 functions on the risk of docetaxel-induced hematotoxicity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：分子薬物動態学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：血液毒性、トランスポーター、好中球、抗がん剤、体内動態、OATP1B3、MRP2

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤の用量規定毒性の1つとして骨髄抑制に伴う好中球減少があり、臨床における抗がん剤の適正使用を困難にしている。一般に副作用の重篤度と血漿中薬物濃度下面積(AUC)との間には相関関係が成立するが、一方で AUC が同様の患者においても副作用の

程度には大きな個人差が見られることが多くの臨床報告から明らかにされている。このことを薬物動態学的観点から捉えると、副作用の個人差は、抗がん剤の全身での体内動態の個人差と抗がん剤の血球移行性や各血球細胞の薬物曝露量に対する殺細胞感受性の個人差の両方に起因すると考えられ、これら

両方を定量的に予測することが出来れば、抗がん剤の好中球減少の副作用を予見できると考えられる。さらに、これらを規定する分子として、種々の代謝酵素・トランスポーターの関与が想定され、遺伝子多型や薬物間相互作用などによるこれらの発現量や機能変化が抗がん剤の血球減少の程度を決定付ける可能性がある。

近年、Kiyotani らと申請者が所属する研究室との共同研究により、抗がん剤 docetaxel により誘起される好中球減少の重篤度と関連する遺伝子変異を探索したところ、有機アニオンの取り込みトランスポーターである organic anion transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) と、排出トランスポーターである multidrug resistance associated protein 2 (MRP2) それぞれのタグ SNPs が探索された(Kiyotani K et al., *Cancer Sci.*, 99, 967-72 (2008))。Docetaxel は両方の基質となることは当研究室の検討を含め既に確認されており、両トランスポーターの輸送機能の変動により docetaxel の副作用発現に影響が出ることは説明可能である。ただ、OATP1B3 は docetaxel の肝取り込みを決定し、その機能低下は、クリアランス低下、全身曝露の上昇につながると考えられるが、一方、docetaxel は CYP3A4 により肝臓内で代謝され、未変化体での胆汁排泄はほとんどないことから、排泄トランスポーターである MRP2 の機能低下による胆汁排泄の低下があっても薬物動態は変化しないと考えられる。そこで別の仮説として MRP2 が血球系細胞に発現し、機能低下が起こることで薬物の血球系細胞への曝露が上昇し、血球減少が起こったと考える。これまで、血球細胞における薬物トランスポーターの発現については、数少ない研究があるのみであり、さらに血球細胞への薬物分布を決定付けるトランスポーターの役割、ならびに血球減少の副作用との関連など臨床的重要性についてはほとんど研究が行なわれていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、抗がん剤の重篤な副作用の 1 つである、骨髄抑制に伴う好中球減少を規定する要因として、抗がん剤の全身での曝露ならびに血球への移行に伴う殺細胞活性の両方を考慮し、抗がん剤による血球減少を定量的に予測するための方法論の構築を目的としている。

抗がん剤の全身曝露については、*in vitro* 実験で得られた代謝酵素・トランスポーターの活性を元に適切な数理モデルを構築することにより予測を行う。さらに血球への抗がん剤の移行性を決める要因として、種々の取り込み・排泄トランスポーターに関して、血球前駆細胞から成熟過程にいたる分化系譜

上の各細胞での発現プロファイルや、各細胞への抗がん剤の分布特性を明らかにするとともに、薬物曝露と殺細胞活性の関係を細胞種ごとに決定することにより、どの細胞への曝露が最終的な血球減少につながっているかについて定量的な考察を試みる。最終的には、抗がん剤の薬物動態予測モデルと血球減少予測モデルを連結させることにより、個々のトランスポーターや代謝酵素の機能が、最終的な抗がん剤の血球減少の副作用の程度に与える影響について定量的に予測できる方法論の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) docetaxel のヒト肝取り込み過程における OATP1B3 の寄与率の解析

Docetaxel の血液毒性の重篤度を決定する要因の一つとして OATP1B3 の遺伝子多型が臨床報告より発見されたことを受けて、*in vitro* 実験で、docetaxel のヒト肝臓取り込みに占める OATP1B3 の定量的な寄与率の算定を行った。寄与率の算定法としては、研究代表者が以前の研究で構築した方法に基づき、OATP1B1, OATP1B3 遺伝子発現細胞並びにヒト凍結幹細胞における docetaxel ならびに OATP1B1, OATP1B3 のそれぞれの選択的基質である estrone-3-sulfate (E-sul), cholecystokinin octapeptide (CCK-8) の取り込みを測定した。また、E-sul が OATP1B1 のみを選択的に阻害する性質を利用して、ヒト肝細胞への docetaxel の取り込みに対する E-sul の阻害効果を観察した。

(2) docetaxel の血液毒性を決定する要因としての MRP2 の役割の解析

上記と同様の報告の中で、Docetaxel の血液毒性の重篤度を決定するもう一つの要因として、MRP2 の遺伝子多型が挙げられたことを受けて、MRP2 の血液毒性に対する役割を *in vitro* 実験を通じて考察した。実証にあたっては、docetaxel が代謝により肝消失することから胆汁排泄過程とは考えにくく、肝臓の胆管側の MRP2 の機能低下よりは、むしろ血球細胞上の MRP2 の機能低下が、血球への docetaxel の曝露を上昇させたとする仮説をたて、その実証を試みた。

MRP2 安定発現細胞における docetaxel の濃度依存的な毒性発現を、MRP2 非発現細胞と比較することで、毒性に対する影響を調べた。また、MRP2 発現・非発現細胞間での docetaxel の細胞内蓄積についても比較を行った。さらに、ラット骨髄細胞を用いて、G-CSF による誘導条件下での血球細胞のコロニー形成に対する docetaxel の抑制作用に関して、MRP 阻害剤である MK571 共存、また *Mrp2* を欠損するラットより採取した骨髄細胞を用いた条件下での変動を観察した。

(3) docetaxel の血中濃度推移、血球減少に与える影響を考慮した PK/PD モデルを構築による OATP1B1, MRP2 機能変動の意義についての検討

OATP1B1, MRP2 の機能がどの程度変化した場合、好中球減少のリスクがどの程度高まるかについて、定量的な *in silico* 数理モデルに基づくシミュレーションによる解析を実施した。Docetaxel のクリアランスや好中球減少に対する影響を規定する EC50 値の個人間変動をモンテカルロシミュレーションにより再現し、一定の population における重篤な好中球減少が起こる割合を推定する手法を用いて、モデル中の OATP1B1, MRP2 機能が遺伝子多型によりどの程度変動していると先行の臨床研究における血液毒性のリスク上昇を説明できるかについて、考察を行った。

(4) MRP2 のヒト試験における非侵襲的プロブ薬の探索

MRP2 は、ヒト肝臓の胆管側にも多く発現していることから、遺伝子多型による機能変化を観察するためには、肝臓内濃度が必要となってくる。しかしながら、ヒト試験において肝臓内濃度を直接測定することは不可能であることから、イメージング技術など間接的な方法を用いた定量法が必要である。そこで、MRP2 の非侵襲的プロブ薬として、肝シンチグラム Gd-EOB-DTPA が用いうる可能性を考え、*in vitro* 実験を行った。

4. 研究成果

(1) docetaxel のヒト肝取り込み過程における OATP1B3 の寄与率の解析

Docetaxel の取り込みに働くトランスポーターを同定するために、ヒト肝臓の血管側に発現する複数の有機アニオン・カチオントランスポーターについて、基質となるかどうかを調べたところ、docetaxel は OATP1B3 によってのみ取り込まれることが明らかとなった。さらに、ヒト肝細胞における取り込みに対する阻害剤の阻害効果を観察したところ、OATP1B1, OATP1B3 両方の阻害剤である estradiol-17 β -glucuronide による docetaxel の取り込み阻害は観察されたものの、OATP1B1 選択的阻害剤である E-sul によっては、docetaxel の取り込みの阻害は観察されなかった。以上より、docetaxel は、ヒト肝臓においては OATP1B3 によって主に取り込まれており、OATP1B3 による取り込みが肝クリアランス全体の決定要因となっている可能性が示唆された。従って、OATP1B3 の遺伝子多型により輸送機能が低下し、全身の暴露が上昇した結果として、血液毒性のリスクが高まったと考えることができる。

(2) docetaxel の血液毒性を決定する要因としての MRP2 の役割の解析

MRP2 発現細胞においては、非発現細胞と比較して、docetaxel の濃度依存的な毒性発現が、高濃度側にシフトすることが分かり、さらに、MRP2 発現細胞においては、docetaxel の蓄積も減少していたことから、MRP2 が docetaxel の細胞内への蓄積を抑制する要因として働きうることが示された。さらに、ラット骨髄細胞のコロニー形成に対する docetaxel の抑制作用について観察した結果、MRP2 欠損ラットである EHBR より採取した骨髄細胞や、MRP 阻害剤である MK571 存在下でのコロニー形成に対する docetaxel の阻害効果は、通常の状態より強く出ることが示唆された。以上の結果より、血球細胞もしくはその前駆細胞に発現する MRP2 によって、docetaxel が細胞内から排出されることにより、防御的な役割を果たしている可能性が示唆された。また、MRP2 の遺伝子多型によって、機能低下が起こると考えれば、血液細胞局所における docetaxel の暴露が上昇し、その結果毒性発現リスクが高まったと考えれば、臨床における結果を矛盾なく説明できることが分かった。

(3) docetaxel の血中濃度推移、血球減少に与える影響を考慮した PK/PD モデルを構築による OATP1B1, MRP2 機能変動の意義についての検討

Docetaxel 誘発性の血液毒性の発現をシミュレーションできる数理モデルを過去の報告を参考にしながら構築した。その中で、OATP1B3, MRP2 の機能を低下させたときの血液毒性のオッズ比の上昇を、先の臨床研究の結果と合うように置いたところ、OATP1B3, MRP2 の遺伝子多型により、輸送機能が 41%, 36%にまで低下していれば、臨床報告と同様の好中球減少のリスク上昇が起こりうることを示すことができた。このような解析を通じて、抗がん剤を基質とするトランスポーターの機能が変動した際に、抗がん剤による好中球減少のリスクを集団内のばらつきを考慮したうえで推定できる可能性が示唆された。

(4) MRP2 のヒト試験における非侵襲的プロブ薬の探索

Gd-EOB-DTPA を基質とするトランスポーターの探索のため、*in vitro* 遺伝子発現系を用いた輸送実験を試みた。その結果、肝取り込み過程については、主に OATP1B3 が寄与することを示すことができ、さらに、胆汁排泄については、MRP2 の良好な基質となることが明らかとなった。以上のことより、Gd-EOB-DTPA は、OATPs ならびに MRP2 の良好な基質となる

ことが明らかとなり、これらのヒト肝臓における機能を見積もるための非侵襲的プローブとしての利用可能性が考えられた。

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9件)

①山田哲裕、前田和哉、杉山雄一、薬物動態関連遺伝子変異と臨床薬理、治療学、査読無(招待)、43(3)、2009、pp.28-39

②前田和哉、トランスポーターと薬物毒性、遺伝子医学MOOK「最新トランスポーター研究2009」、査読無(招待)、12、2009、pp.163-174

③山田哲裕、前田和哉、杉山雄一、薬物動態と医薬品の薬効・副作用—トランスポーターを中心として、治療学、査読無(招待)、43(12)、2009、pp.1267-1280

④山田哲裕、前田和哉、清谷一馬、筵田泰誠、中村祐輔、杉山雄一、ドセタキセルに起因する好中球減少症を決定するOATP1B3、MRP2の役割に関する解析、Jpn Pharmacol Ther、査読無、38 (suppl.2)、2010、pp. S-85-S-91

⑤前田和哉、杉山雄一、創薬におけるin vitro ヒト組織細胞を利用した薬物動態・薬効・副作用予測の重要性、医学のあゆみ、査読無(招待)、232、2010、pp. 83-88

⑥前田和哉、胆汁排泄とトランスポーター、日本薬理学雑誌、査読無(招待)、135、2010、pp. 76-79

⑦前田和哉、OATP1B1の遺伝子多型が基質薬物の体内動態・薬効・副作用に与える影響、Drug Metab Pharmacokinet (ニューズレター)、査読無(招待)、25、2010、pp. 9-14

⑧前田和哉、杉山雄一、薬物相互作用による薬物動態の変動予測法の開発、遺伝子医学MOOK別冊(創薬技術の革新: マイクロドーズからPET分子イメージングへの新展開)、査読無(招待)、2010、pp. 63-73

⑨Maeda, K. and Sugiyama, Y., The Use of Hepatocytes to Investigate Drug Uptake Transporters., Methods Mol Biol、査読有、640、2010、pp. 327-353

[学会発表] (計7件)

①山田哲裕、前田和哉、清谷一馬、筵田泰誠、中村祐輔、杉山雄一、ドセタキセル誘導性の

骨髄抑制の重篤度を決定付ける薬物トランスポーターの重要性、日本薬剤学会第24年会、2009年5月22日、静岡

②山田哲裕、前田和哉、清谷一馬、筵田泰誠、中村祐輔、杉山雄一、薬物トランスポーターの遺伝子変異がドセタキセルによる重篤な骨髄抑制の発症頻度に影響を与えるメカニズムの検討、日本人類遺伝学会第54回大会、2009年9月24日、東京

③山田哲裕、前田和哉、清谷一馬、筵田泰誠、中村祐輔、杉山雄一、ドセタキセルに起因する好中球減少症を決定するOATP1B3、MRP2の役割に関する解析、第18回肝病態生理研究会、2010年5月26日、山形

④ Kazuya Maeda、Use of Human Cryopreserved Hepatocytes for the Prediction of the Hepatobiliary Transport of Drugs, Hepatocyte Expert Program 2010、2010年6月28日、東京

⑤山田哲裕、前田和哉、清谷一馬、筵田泰誠、中村祐輔、杉山雄一、ドセタキセルによる重篤な好中球減少症の発症におけるOATP1B3、MRP2の役割、第14回日本がん分子標的治療学会学術集会、2010年7月8日、東京

⑥山田哲裕、前田和哉、清谷一馬、筵田泰誠、中村祐輔、杉山雄一、ドセタキセル誘発性好中球減少症のリスクを決定するOATP1B3、MRP2の役割、第5回トランスポーター研究会年会、2010年7月10日、東京

⑦前田和哉、薬物間相互作用を定量的に予測するための考え方: 数理モデルを通じた理解、第314回CBI研究講演会、2011年1月20日、東京

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 和哉 (MAEDA KAZUYA)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号: 00345258