

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32305

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20729

研究課題名(和文) P-糖たんぱくを介した複合的な薬物相互作用によるピモジドのhERG阻害の解析

研究課題名(英文) Analysis of pimoziide hERG inhibition by complex drug interactions via P-glycoprotein.

研究代表者

LIYANAGE・PERERA MANOSIKA・BUDDHINI (Liyanage Perera, Manosika Buddhi ni)

高崎健康福祉大学・薬学部・博士研究員

研究者番号：50912606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、P-糖たんぱく(P-gp)を介した細胞内蓄積とピモジドのhERG阻害作用の関係について検討した。心筋細胞由来の細胞におけるピモジドの蓄積は、P-gpの阻害薬であるsertralineおよびaripiprazoleによって増加した。一方、AC16細胞にピモジドを添加すると、濃度依存的にhERG電流が阻害された。このことから、P-gpを介した相互作用によりAC16細胞内のピモジド蓄積量が増加し、細胞内のピモジド濃度が上昇することで、hERGチャンネルが細胞内から阻害されQT延長などの循環器系リスクが高くなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、P-gpを介した相互作用によって心筋細胞内へのピモジドの蓄積量が増加することで、hERG阻害作用が増強される可能性が示唆された。ピモジドに限らずhERG阻害薬を有する薬物においては、同様のメカニズムによってQT延長や致死的不整脈発症の原因のひとつになる可能性が考えられた。薬物動態学的相互作用を検討する際には、血中濃度上昇を伴うsystemicなDDIのみならず、組織分布過程におけるトランスポーターを介したLocal-DDIについても考慮する必要があるものと考えられた。今回の我々の研究成果は今後の医薬品開発や患者の医療安全に貢献できるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Pimoziide, an antipsychotic drug, is an inhibitor of the hERG channel. A death has been reported in a boy who received pimoziide together with sertraline and aripiprazole. In this study, we investigated the relationships between transporter-mediated intracellular accumulation and the hERG inhibitory effect of pimoziide. The accumulation of pimoziide in cardiomyocyte-derived AC16 cells was increased by sertraline and aripiprazole, which are thought to have a P glycoprotein (P-gp) inhibitory effect, and under siRNA conditions. These results suggest P-gp inhibition increases pimoziide accumulation in AC16 cells. We investigated the concentration-dependent hERG inhibitory effect of pimoziide from within AC16 cells. Addition of pimoziide inhibited the hERG current with concentration dependence. This indicate P-gp-mediated interactions increases pimoziide accumulation in AC16 cells, and the elevated pimoziide levels within the cells may result in an increased risk of hERG channel inhibition.

研究分野：drug-drug interactions

キーワード：ピモジド p-糖タンパク質 心筋細胞 hERG QT延長 薬物相互作用

1. 研究開始当初の背景

Human ether-a-go-go related gene (hERG) 関連遺伝子がコードするカリウムチャンネルは、心筋の脱分極に重要な役割を担っている。¹これらのチャンネルを阻害する薬物は QT 延長を引き起こすため、慎重に使用する必要がある。統合失調症や小児自閉症の治療に用いられてきた抗精神病薬である pimozone は、hERG チャンネルの強力な阻害薬であり、致命的な不整脈を引き起こすことが報告されている。²Pimozone に sertraline および aripiprazole を併用した男児において、心停止による死亡例が報告されている。³詳細な機序は不明だが、sertraline との併用で pimozone の血中濃度が上昇し QT 延長のリスクが高まるため、この 2 剤の併用は禁忌とされていた。我々は、この心臓突然死の原因の一つとして、消化管吸収過程における P-glycoprotein (P-gp) を介した薬物間相互作用によって pimozone の血中濃度が上昇する可能性について検討し、その成果を報告した。⁴具体的には、Caco-2 細胞および P-gp を過剰発現させた LLC-PK1-CoL150 細胞を用いて、pimozone が P-gp の基質であることを確認した。

2. 研究の目的

Pimozone、sertraline、aripiprazole の併用は、P-gp を介した薬物動態相互作用により pimozone の血中濃度を上昇させるだけでなく pimozone の心筋細胞への蓄積を増加させる可能性があると考えられた。そこで、ヒト心筋由来細胞 (AC16 細胞) を用いて、pimozone の細胞内蓄積量と hERG チャンネル阻害作用について検討することとした。

3. 研究の方法

AC16 細胞を P-gp siRNA で処理し、mRNA の発現量を評価した。

AC16 細胞に P-gp が機能的に発現しているかどうかを調べるため、Rhodamine123 (Rho123) の取り込み試験を検討した。

SiRNA 条件下での pimozone の AC16 細胞内取り込みについて検討した。

P-gp 阻害薬である sertraline および aripiprazole が pimozone の取り込みに及ぼす影響について評価した。

HERG を導入した AC16 細胞を用いて、whole cell patch clamp 法にて、hERG 電流に対する pimozone 影響を観察した。この時、pimozone を細胞内に添加することで、細胞の内側から hERG チャンネルを阻害するか否かについて検討した。

4. 研究成果

AC16 細胞における P-gp mRNA の発現レベル

AC16 細胞における P-gp の mRNA 発現量は 0.81 であったが、siRNA 処理により 0.41 まで有意に低下した (図 1)。

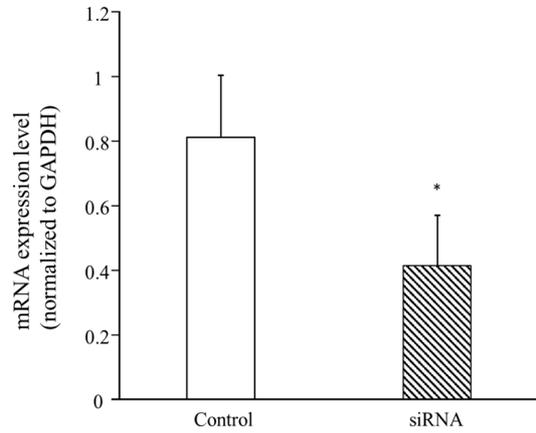


図1. AC16 細胞における P-gp mRNA の発現量

Control: Stealth RNAi™ ネガティブコントロール, SiRNA: P-gp siRNA (sequence: 5'- UCC CGU AGA AAC CUU ACA UUU AUG G -3') である。棒グラフは、GAPDH の発現量に対して正規化した mRNA の発現量を示す。データは平均値 ± S.E.M. で示す (n = 4)。*は control と比較して p < 0.05。

AC16 細胞における Rho123 の蓄積

Elactridar 非存在下および存在下での Rho123 の C/M 比は、それぞれ 67 および 155 $\mu\text{L}/\text{mg}$ protein であった。AC16 細胞への Rho123 の蓄積は、elactridar 存在下で 2.3 倍まで有意に増加した (図 2a)。AC16 細胞における Rho123 の C/M 比は 40.5 $\mu\text{L}/\text{mg}$ protein であり、ネガティブコントロール群および siRNA 処理群のそれはそれぞれ 42.8 $\mu\text{L}/\text{mg}$ protein と 48.9 $\mu\text{L}/\text{mg}$ protein だった。AC16 細胞への Rho123 の取り込みは、siRNA 条件下で最大 1.2 倍まで有意に増加した (図 2b)。

この結果は、P-gp が AC16 細胞で機能的に発現していることを示唆しており、P-gp が AC16 細胞で発現しているという既報の結果を支持するものである。⁵さらに、本研究は AC16 細胞における P-gp の輸送能力を評価した最初の研究となり得る。

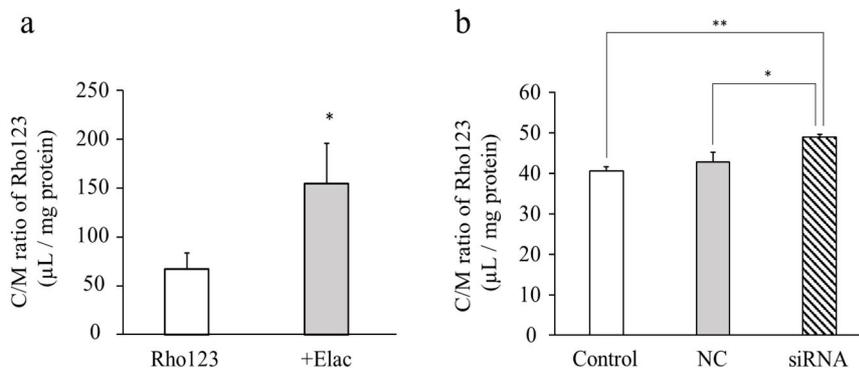


図2. AC16 細胞における Rho123 の細胞内蓄積

AC16 細胞を用いて、10 μM Rho123 取り込み試験を行った。データは平均値 ± S.E.M. で示した (n = 4)。(a) AC16 細胞における elactridar 非存在下または存在下での Rho123 の C/M ratio を示した。Elac: elactridar 50 nM。*は p < 0.05。(b) siRNA 条件下での Rho123 の C/M ratio を示した。Control: 未処理の AC16 細胞, NC; siRNA ネガティブコントロール, siRNA: P-gp siRNA。**は control と比較して p < 0.01。*はネガティブコントロール (NC) と比較して p < 0.05。

SiRNA 条件下での pimozide の C/M 比

AC16 細胞における pimozide の C/M 比は 7.4 $\mu\text{L}/\text{mg}$ protein であり、ネガティブコントロール群お

よび siRNA 処理群のそれはそれぞれ 16.6 $\mu\text{L}/\text{mg protein}$ および 68.3 $\mu\text{L}/\text{mg protein}$ であった。AC16 細胞への pimozide の取り込みは、siRNA 条件下で有意に増加し、siRNA 処理群ではコントロールの 9.2 倍となった (図 3)。このことから、ピモジドは P-gp の基質であることが示唆され、過去の報告結果と一致した。⁴

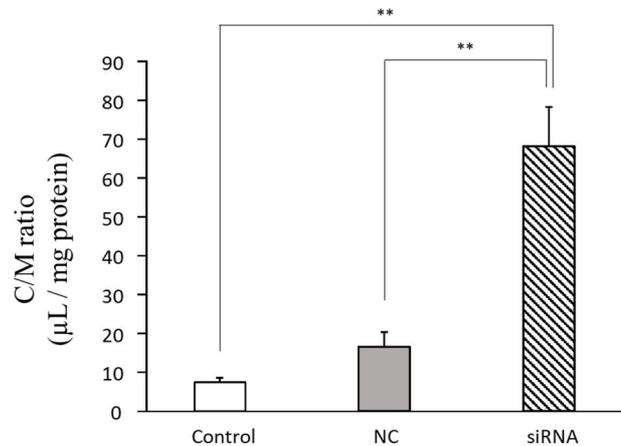


図 3. siRNA 条件下での pimozide の細胞内蓄積

AC16 細胞を用いて siRNA 条件下における、1 μM の pimozide 取り込み試験を行った。Control: 未処理の AC16 細胞。NC: Stealth RNAi™ ネガティブコントロール。siRNA: P-gp siRNA。データは平均値 \pm S.E.M. で示す ($n=3-4$)。**は Control およびネガティブコントロール (NC) と比較して $p < 0.01$ 。

AC16 細胞における pimozide の取り込みに対する P-gp 阻害剤の影響

AC16 細胞における pimozide の C/M 比は 33.9 $\mu\text{L}/\text{mg protein}$ であった。Sertraline または aripiprazole との併用、あるいは両者の併用により、pimozide の C/M 比はそれぞれ 102.2、79.6、125.0 $\mu\text{L}/\text{mg protein}$ まで有意に増加した (図 4)。これらの結果は、sertraline と aripiprazole の P-gp 阻害作用により、ピモジドの心筋細胞内へ蓄積量を上昇させたことが示唆された。

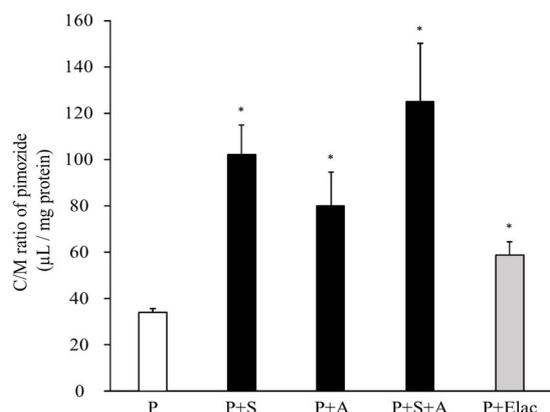


図 4. AC16 細胞を用いた P-gp 阻害薬非存在下または存在下における pimozide 取り込み試験

AC16 細胞を用いて sertraline (S; 130 nM) および/または aripiprazole (A; 60 nM) 非存在下または存在下における pimozide (P; 20 nM) 取り込み試験を行った。Elactridar (Elac; 50 nM) はポジティブコントロールとして使用した。データは平均値 \pm S.E.M. で示した ($n=3-6$)。**は pimozide 単独と比較して $p < 0.01$ 。

hERG 電流に対する pimozide の影響

今回の whole cell patch clamp 試験では、内溶液に pimozide を添加することで、細胞の中側からの

hERG チャンネル阻害作用を調査した。図 5a は、pimozide の存在下または非存在下における AC16 細胞の hERG 電流を示し、下段は電圧パルスを示した。内溶液に 10 nM および 100 nM の pimozide を添加した場合、hERG 電流は、コントロールと比較してそれぞれ 59.2% および 53.1% と有意に抑制された (図 5b)。これらの結果は、pimozide が細胞内から hERG チャンネルを阻害していることが示唆された。

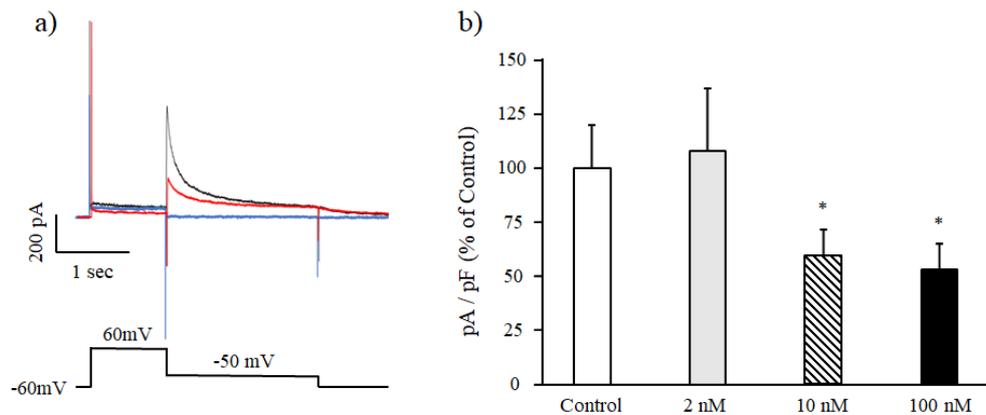


図 5. Pimozide の濃度依存的な hERG 阻害効果

各条件下での hERG 電流の典型的なトレースを示した (図 5a の上段)。黒線 (上線) は hERG トランスフェクトした AC16 細胞の電流を示し、赤線 (中線) は 10 nM pimozide を導入した hERG トランスフェクトした AC16 細胞の電流を示し、青線 (下線) は AC16 細胞 (トランスフェクトなし) の電流を示す。図 5a の下段は、-60 mV の保持電位から +60 mV まで電圧パルスを印加し、その後 -50 mV まで 2 秒間再分極したときのプロットであり、各 pimozide 濃度における pA/pF 値 (Control に対する%) を示した (b)。白、灰、斜め、黒のバーは、それぞれ内溶液中の 0、2、10、100 nM の pimozide 濃度を表す。データは平均値 ± S.E.M. で示した (n=3-7)。*は control と比較して $p < 0.05$ 。

以上の検討から、P-gp を介した薬物動態学的相互作用により、AC16 細胞へのピモジドの蓄積が増加し、その後の細胞内のピモジド濃度の上昇により、hERG チャンネル阻害のリスクが増加する可能性を示した。本研究は、心毒性を有する P-gp 基質と P-gp 阻害薬の併用に伴うリスクに注意を喚起するものである。

引用文献

- Vandenberg JI, Perry MD, Perrin MJ, Mann SA, Ke Y, Hill AP. hERG K⁺ channels: structure, function, and clinical significance. *Physiol Rev.* 2012;92(3):1393-1478. doi:10.1152/physrev.00036.2011
- Kang J, Wang L, Cai F, Rampe D. High affinity blockade of the HERG cardiac K⁺ channel by the neuroleptic pimozide. *Eur J Pharmacol.* 2000;392(3):137-140. doi:10.1016/s0014-2999(00)00123-0.
- Alderman J. Coadministration of sertraline with cisapride or pimozide: an open-label, nonrandomized examination of pharmacokinetics and corrected QT intervals in healthy adult volunteers. *Clin Ther.* 2005;27(7):1050-1063. doi: 10.1016/j.clinthera.2005.07.013.
- Morishita H, Okawa K, Ishii M, et al. Gastrointestinal absorption of pimozide is enhanced by inhibition of P-glycoprotein. *PLoS One.* 2020;15(10):e0232438. doi:10.1371/journal.pone.0232438
- Li S, Yuan S, Zhao Q, Wang B, Wang X, Li K. Quercetin enhances chemotherapeutic effect of doxorubicin against human breast cancer cells while reducing toxic side effects of it. *Biomed Pharmacother.* 2018;100:441-447. doi:10.1016/j.biopha.2018.02.055

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroki Morishita, Liyanage Manosika Buddhini Perera, Xieyi Zhang, Kenta Mizoi, Masa-aki Ito, Kentaro Yano, Takuo Ogiwara	4. 巻 111
2. 論文標題 P-Glycoprotein - Mediated Pharmacokinetic Interactions Increase Pimozide hERG Channel Inhibition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 3411-3416
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2022.09.025	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 リヤナゲ マノシカ ブッディニ ペレーラ、森下 宙輝、伊藤 政明、矢野 健太郎、溝井 健太、荻原 琢男
2. 発表標題 P-gp-mediated drug-drug interaction promotes gastrointestinal absorption and myocardial accumulation of pimozide causing hERG channel inhibition
3. 学会等名 日本薬物動態学会 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Liyanage Manosika Buddhini Perera, Hiroki Morishita, Hiroki Sunakawa, Takuo Ogiwara
2. 発表標題 P-gp-mediated drug-drug interaction promotes gastrointestinal absorption of pimozide and the risk of QT prolongation due to hERG channel inhibition—Fundamental studies and validation in clinical practice
3. 学会等名 日本医療薬学会2023（国際学会）
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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