

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590211

研究課題名(和文)新規神経変性疾患治療薬の体内動態から見た有効で安全な個別化薬物投与設計の提案

研究課題名(英文)The most suitable administration of antidepressive drug to avoid risk of side effects in patient

研究代表者

村山 典恵(MURAYAMA, Norie)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90219949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：向精神薬服用患者は治療効果向上のために併用される薬物の種類と数は多岐に渡り、現在相互作用の点で見直しが必要になっている。薬物血中濃度は特に治療効果へ影響することからその変動要因として、代謝酵素の遺伝子多型の関与について対象薬剤投与患者78例の解析情報をもとに検討を行った。その結果、多くの場合遺伝子多型は薬物血中濃度の変動要因の1つにはなるが、限定されたものであり、いくつかの変異が相互に関連することで影響が認められることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The plasma concentrations of mirtazapine in patients are influenced by many factors, such as polymorphic cytochrome P450 enzymes contributing to its transformation to the metabolites. The aim of this study was to investigate the determinant factors for individual variations of metabolic clearance of mirtazapine using in vitro and in vivo methods. The plasma concentration/dose ratios of mirtazapine from 14 patients were significantly higher in the CYP2D6 IM/PM group than in the EM group and were also higher in the CYP3A5 poor-expressors group than in the expressors group ($p < 0.05$). In vitro, mirtazapine 8-hydroxylation activities in individual liver microsomes were significantly lower in CYP2D6 intermediate metabolizers (IM) and poor metabolizers (PM) than in extensive metabolizers (EM) ($p < 0.05$). These results suggested that mirtazapine metabolic clearance could be variously influenced by the CYP2D6 and CYP3A5 genotypes and coadministered drugs in clinical patients.

研究分野：薬物代謝

キーワード：P450 向精神薬 相互作用 酵素誘導 遺伝子多型 CYP3A5

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマーおよびうつ病は現在増加の傾向にあり、疾患の状態も患者によってまちまちであることから作用機序の異なる薬剤が複数処方される場合が多い。特に新規薬物を用いる場合には相互作用の影響が問題となってくるが、詳細な情報が少ないのが現状であった。臨床で安全かつ有効な治療効果が発揮されるためには、血中薬物濃度が大きく関与しておりこの血中濃度に影響を与える要因を解明することは重要な課題であった。

2. 研究の目的

うつ病およびアルツハイマー病の治療において有効な薬物投与設計を行うために定形および非定形薬物の体内動態に影響を及ぼす要因について明らかにする。また、臨床検体と文献値を集積し母集団解析を行うことで、現代人のうつ病発症におけるバイオマーカーについて探索する。

3. 研究の方法

In vivo については、共同研究先の病院より対象薬剤を実際に使用している患者から血液を採取し、血中の薬物濃度および時間的推移を行い、一方で対象薬剤の代謝に関与する酵素の遺伝子多型について PCR-RFLP とダイレクトシーケンス法によって遺伝子多型解析を行った。*In vitro* では、発現系および肝ミクロソームを用いて薬物の代謝・消失に関して速度論的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 複数治療薬物の同時分析法の確立

精神疾患治療では複数薬剤を投与されるため、治療薬の同時分析法の確立を行った。検討の結果、オランザピン、リスペリドン、クエチアピン、アリピプラゾール、ミルタザピン、デュロキセチン、ドネペジルならびに活性代謝物である 9-ヒドロキシリスペリドンおよびデヒドロアリピプラゾールを分離分析できる条件を見出した (Fig. 1)。実際の血漿サンプルでは薬物濃度が低く、生体成分混入のために、検体によってはうまく測定できない事例もあったが、本条件を一部改変することで多くの臨床検体の血漿中濃度測定が可能となった。

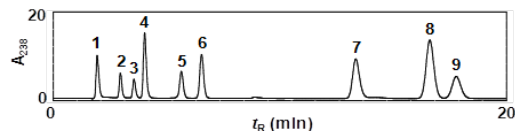


Fig.1 HPLCによる精神疾患治療薬標準液のクロマトグラム
1: オランザピン, 2: ミルタザピン, 3: 9-ヒドロキシリスペリドン, 4: リスペリドン, 5: ドネペジル, 6: クエチアピン, 7: デヒドロアリピプラゾール, 8: アリピプラゾール, 9: デュロキセチン

(2) ミルタザピンの代謝消失と遺伝子多型との関連性

近年精神疾患は増加傾向にあり、非定型抗精神病薬や新規作用機序での抗うつ薬など新薬が上市され、既に臨床で用いられている。しかしこれら薬剤は安全性に十分な注意が必要であるにもかかわらず、個人に合わせた

治療法は未だ確立されていない。

2009年に本邦で上市されたノルアドレナリン・セロトニン作動性抗うつ薬ミルタザピンは副作用発現率が高いにもかかわらず、個人に合わせた有効な治療法は未だ確立されていない。そこでミルタザピンの代謝はチトクロム P450 (CYP) 1A2, 2D6 および 3A4 によって触媒されることから、ミルタザピンの代謝消失と P450 分子種遺伝子多型との関連性について検討した。ミルタザピン投与患者のトラフ時点での血漿中ミルタザピン濃度を投与量で除した C/D 比は CYP2D6 通常活性群に比べて低活性群で有意に高値を示した (図 2-A)。一方、遺伝子型既知個別肝ミクロソームを用いて算出した、終濃度 10 μM でのミルタザピン消失速度および 8 位水酸化体生成速度は、CYP2D6 通常活性群に比べて低活性群で有意に低値を示した (図 2-B)。また CYP3A4 と相同性の高い 3A5 遺伝子多型の C/D 比は 3A5 発現群に比べて低発現群で有意に高値を示した。組換え CYP3A5 のミルタザピン N-脱メチル化の触媒活性は 3A4 と同等であったことから、3A5 もミルタザピン代謝に寄与している可能性が示唆された。以上より、CYP2D6 および CYP3A5 遺伝子多型がミルタザピン代謝消失に影響を与える可能性が示唆された。

臨床検体を用いて検討したミルタザピン代謝消失に CYP2D6 および CYP3A5 遺伝子多型が関与している可能性が示唆された。

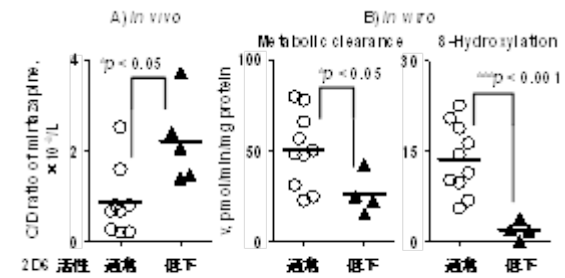


図 2. A) ミルタザピンの C/D 比と遺伝子多型
B) ミルタザピン消失速度および代謝物生成速度と遺伝子多型

(3) ミルタザピン血中濃度への併用薬の影響

In vitro 実験よりミルタザピンの代謝消失速度は、同種酵素で代謝を受ける抗精神病薬リスペリドンおよび抗うつ薬デュロキセチンの単独添加では影響を受けなかったが、両者が存在する条件下では最大 60% 減少した。このことから、ミルタザピン投与時には患者の遺伝子情報および併用薬に注意が必要となる可能性が示された。

(4) 抗精神病薬リスペリドン投与患者の血中濃度に認められる個人差の要因

広く臨床で使用されているリスペリドンの体内動態には代謝に関与する CYP2D6 および CYP3A5 の遺伝的多型が影響することが考えられているが、これまで統一された結果が認められないことから *in vitro* 系で検討を行った。*In vitro* では、遺伝子多型が明らかになっている個別ヒト肝ミクロソームを用

いて、リスペリドンの代謝酵素活性を検討した。リスペリドンの代謝は基質濃度が 5 μ M では、CYP2D6 の IM, PM で有意に活性の低下が認められたが、50 μ M では影響が認められなくなったことから、遺伝子多型の影響は限定的なものであることが明らかとなった。さらに CYP3A5 に関しては、CYP3A4 と同等の代謝活性を有しているが、 V_{max}/K_m が CYP3A4 に比べて小さいことから、生体内での寄与は低いことが示唆された。

(5) 液滴培養法を用いたヒト肝由来 HepaRG 細胞培養系の確立

生体内薬物動態に関して、検討するうえでヒト肝由来細胞培養系は有効であるにもかかわらず、細胞のロット間で基底レベルの薬物代謝能や誘導効果に違いが認められることが課題となっていた。そこで、1ロットでより多くの情報を確認できることを目的にして、新規開発された3次元培養用のハンギングプレートを用いて、液滴下で肝細胞をスフェロイド化し、機能を維持した細胞培養系を確立した。(Fig 3)

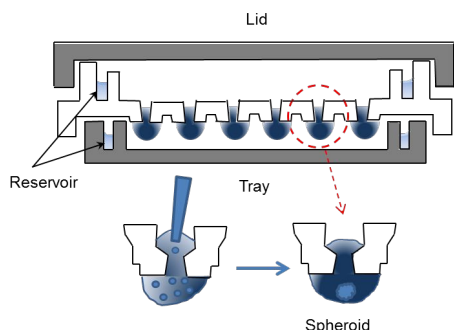


Fig. 3. Cutaway side view of the hanging-drop culture plate

培養細胞数を3段階に設定し、各濃度で誘導剤加によるCYP分子種のmRNAレベルを1, 2, 3日目で定量した結果、通常24-wellで培養したのと同様の誘導効果が認められた。

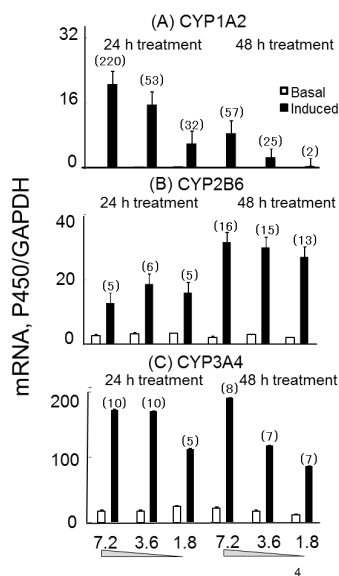


Fig. 2. Induction of human CYP1A2 (A), CYP2B6 (B), and CYP3A4 (C) mRNA in HepaRG

cells. On day 3 after initial plating

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 34件)

Murayama N, Usui T, Slawny N, Chesné C, Yamazaki H. Human HepaRG Cells can be Cultured in Hanging-Drop Plates for Cytochrome P450 Induction and Function Assays. Drug Metab Lett. 査読有 2015, Jan.18.

Okubo M, Murayama N, Miura J, Chiba Y, Yamazaki H. Effects of cytochrome P450 2D6 and 3A5 genotypes and possible coadministered medicines on the metabolic clearance of antidepressant mirtazapine in Japanese patients. Biochem Pharmacol. 査読有;2015, 93(1):104-9. doi:10.1016/j.bcp.2014.11.011.

Yajima K, Uno Y, Murayama N, Uehara S, Shimizu M, Nakamura C, Iwasaki K, Utoh M, Yamazaki H. Evaluation of 23 lots of commercially available cryopreserved hepatocytes for induction assays of human cytochromes P450. Drug Metab Dispos. 査読有 2014, 42(5):867-71. doi: 10.1124/dmd.113.056804.

Murayama N, van Beuningen R, Suemizu H, Guguen-Guillouzo C, Shibata N, Yajima K, Utoh M, Shimizu M, Chesné C, Nakamura M, Guengerich FP, Houtman R, Yamazaki H. Thalidomide increases human hepatic cytochrome P450 3A enzymes by direct activation of the pregnane X receptor. Chem Res Toxicol. 査読有 2014 17;27(2):304-8. doi: 10.1021/tx4004374. Epub 2014 Feb 5

Okubo M, Murayama N, Shimizu M, Shimada T, Guengerich FP, Yamazaki H. CYP3A4 intron 6 C>T polymorphism (CYP3A4*22) is associated with reduced CYP3A4 protein level and function in human liver microsomes. J Toxicol Sci. 査読有 2013; 38(3):349-54

[学会発表](計 7件)

村山典恵、矢島加奈子、柴田哲男、鶴藤雅裕、山崎浩史 サリドマイドによるヒト P450 酵素自己誘導機構の要因 日本薬学会第 135 年会 2015 3月 25 日-29 日 兵庫医療大学、神戸学院大学(兵庫県、神戸市)

大久保真穂、村山典恵、森田翔子、森亜沙美、倉林優貴、秋元洋一、後藤晶子、山崎浩史 抗精神病薬リスペリドン投与日本人患者における血漿中薬物濃度の個人差 日本薬学会第 135 年会 2015 3月 25 日-29 日 兵庫医療大学、神戸学院大学(兵庫県、神戸市)

大久保真穂、成田桃子、村山典恵、森田翔子、中村浩也、清水万紀子、秋元洋一、

後藤晶子、山崎浩史抗精神病薬オランザピン投与日本人患者における血漿中薬物濃度の個人差 日本薬学会第 135 年会 2015 3 月 25 日-29 日 兵庫医療大学、神戸学院大学 (兵庫県、神戸市)

Norie Murayama, Hiroshi Suemizu, Christophe Chesn, Norio Shibata, F. Peter Guengrich, Hiroshi Yamazaki. Roles of Auto-Induction of Human P4503A Enzymes Involved in The Teratogenicity of Thalidomide. 19th North American ISSX Meeting/29th JSSX Meeting 2014, 10 月 19-23 日 Hilton San Francisco (San Francisco, California, USA)

Maho Okubo, Norie Murayama, Jum Miura, Tasuji Chiba, Hiroshi Yamazaki Effects of CYP2D6 and CYP3A5 genotypes and co-administrated drugs on the metabolic clearance of antidepressant mirtazapine 9th North American ISSX Meeting/29th JSSX Meeting 2014, 10 月 19-23 日 Hilton San Francisco (San Francisco, California, USA)

村山典恵、矢島加奈子、Christophe Chesne、Rene Houtman, 山崎浩史サリドマイドは核内レセプターを介してヒト肝薬物代謝酵素を誘導する日本薬学会第 134 年会、2014、3 月 27 日-30 日、熊本大学 (熊本県、熊本市)

大久保真穂、村山典恵、三浦淳、山崎浩史 抗うつ薬ミルタザピンの代謝消失に影響を与える因子 日本薬学会第 134 年会 2014、3 月 27 日-30 日、熊本大学 (熊本県、熊本市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shoyaku.ac.jp/labosite/doutai/indez.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

村山 典恵 (MURYAMA, Norie)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号 : 90219949

(2) 研究分担者

山崎 浩史 (YAMAZAKI, Hiroshi)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号 : 30191274

(3) 研究分担者

清水 万紀子 (SHIMIZU, Makiko)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号 : 90307075