

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460196

研究課題名(和文) 生体肝移植時のカルシニューリン阻害薬の体内動態制御におけるマイクロRNAの役割

研究課題名(英文) Role of microRNA on the pharmacokinetics of calcineurin inhibitors after living liver transplantation

研究代表者

奥田 真弘 (OKUDA, Masahiro)

三重大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70252426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腎移植術後早期にCYP3A5の遺伝子型が欠損型の患者では、免疫抑制薬であるタクロリムスの血中濃度が一過性に上昇することが明らかとなり、その要因としてインターロイキン-6を介したCYP3A4発現量の低下が関与している可能性が示唆された。一方で、臓器移植患者における免疫抑制薬の体内動態の個人差に有意な影響を及ぼすマイクロRNA(miRNA)を同定することができず、miRNAを指標として個別化薬物療法の実現に向け、今後さらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Our study demonstrates that blood concentrations of tacrolimus (an immunosuppressant) are transiently elevated in patients with poor metabolizer of CYP3A5 in the early postoperative period of renal transplantation, and this is attributable to decreased CYP3A4 level via interleukin-6. On the other hand, microRNAs (miRNAs) affecting individual variations in the pharmacokinetics of immunosuppressant after organ transplantations was not identified in the present study. Further study is needed to achieve personalized pharmacotherapy with miRNAs.

研究分野：医療薬学

キーワード：臓器移植 マイクロRNA 免疫抑制薬 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

免疫抑制薬であるカルシニューリン阻害薬は臓器移植患者の術後管理を担うキードラッグであるが、体内動態の個体内・個体間変動が大きく、血中濃度に基づいた綿密な投与設計 (TDM) が行われる。これら薬物動態制御を担うシトクロム P450 (CYP) 3A4 や CYP3A5、P-糖タンパク質 (ABCB1) の発現量には遺伝子多型では説明できない個人差や、タンパク質発現量と mRNA 量の間にはしばしば乖離が認められるため、薬物体内動態の解析・予測を困難にしている。近年、薬物動態関連遺伝子の転写後発現制御におけるマイクロ RNA (miRNA) の役割が脚光を浴びており、免疫抑制薬の血中動態制御に関わる CYP3A4、CYP3A5 及び ABCB1 の発現・機能制御における miRNA の影響も報告されつつある。しかしながら、免疫抑制薬の血中動態制御に及ぼす miRNA の役割については不明である。

2. 研究の目的

臓器移植患者における免疫抑制薬の体内動態変動に及ぼす影響因子について、miRNA の影響を含めた解析を実施する。

3. 研究の方法

(1) CYP3A4、CYP3A5 及び ABCB1 発現量の個人差に及ぼす miRNA の同定

CYP3A4、CYP3A5 及び ABCB1 遺伝子の miRNA の結合部位である 3' -非翻訳領域 (3' -UTR) における遺伝子多型 (SNP) を調査し、その SNP が位置する配列に結合しうる miRNA を *in silico* 法により解析した。

(2) 培養細胞を用いた miRNA の役割に関する検討

in silico 法により同定した miRNA の前駆体をヒト肝癌由来の HepG2 細胞に導入し、タンパク質発現量を Western Blot 法により評価した。

(3) 腎移植患者におけるタクロリムスの体内動態変動の解析

2010 年 1 月から 2015 年 8 月に三重大学医学部附属病院腎泌尿器外科において生体間腎移植術が施行された患者 38 名から、術後 7 日以内に再手術をした患者 (3 名) タクロリムス薬物動態に影響する薬物を併用した患者 (22 名) 調査項目を抽出できなかった患者 (5 名) を除外した 16 名を対象とした。対象患者を CYP3A5 遺伝子型に応じて extensive metabolizer (EM 群) および poor metabolizer (PM 群) に分類し、術後のタクロリムス血中濃度/投与量比 (C/D 比) の推移を調査した。

(4) 培養細胞を用いた CYP3A4 及び CYP3A5 遺伝子の変動機構の解析

CYP3A4 及び CYP3A5 mRNA 発現に対するインターロイキン 6 (IL-6) の影響を調査するために、HepG2 細胞に IL-6 を暴露し、CYP3A4

及び CYP3A5 mRNA 量の変化を RT-PCR により解析した。

4. 研究成果

(1) CYP3A4、CYP3A5 及び ABCB1 発現量の個人差に及ぼす miRNA の同定

in silico 法により CYP3A4、CYP3A5 及び ABCB1 の 3' -UTR に存在する SNP を解析した結果、これらの遺伝子の 3' -UTR には多数の SNP が存在することが明らかになった。しかしながら、アレル頻度は低く、免疫抑制薬の体内動態の個人差の原因となる可能性は極めて低いと考えられた。

一方で、CYP3A4 及び ABCB1 の発現調節に関わることが知られる核内受容体 PXR (NR1I2) の 3' -UTR には、アレル頻度の高い SNP が存在し、この配列に結合する miRNA を *in silico* 法により解析した結果、miR-328-3p が作用する可能性を見出した。

(2) 培養細胞を用いた PXR の発現調節における miRNA の役割に関する検討

miR-328-3p に対する miRNA 前駆体を HepG2 細胞にトランスフェクション後、PXR の mRNA 発現量及びタンパク質発現量を評価したが、有意な変動は認められず、miR-328-3p は PXR の発現調節に及ぼす影響は少ない可能性が示唆された。

(3) 腎移植患者におけるタクロリムスの体内動態変動の解析

PM 群ではタクロリムスの C/D 比の有意な変動が認められ、術後 4 日目をピークとして、血中濃度が一過性に上昇していた (図 1)。一方で、EM 群では有意な変動は認められなかった。

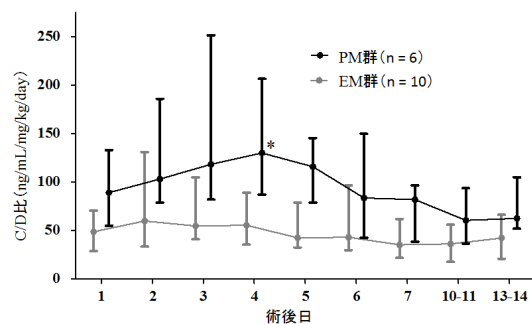


図 1 腎移植術後 14 日間におけるタクロリムス血中濃度/投与量比 (C/D 比) の推移 (中央値 (25-75 パーセンタイル) Friedman test: $p < 0.01$ 、*: Pairwise comparisons using Wilcoxon signed rank test: $p = 0.036$ (adjusted by holm method, vs 術後 1 日目))

(4) 培養細胞を用いた CYP3A4 及び CYP3A5 遺伝子の変動機構の解析

HepG2 細胞に IL-6 を暴露し、CYP3A4 及び CYP3A5 mRNA 量の変化を解析した結果、両遺伝子ともに IL-6 濃度依存性的および時間依存

的な発現量の低下が認められた (図 2)。

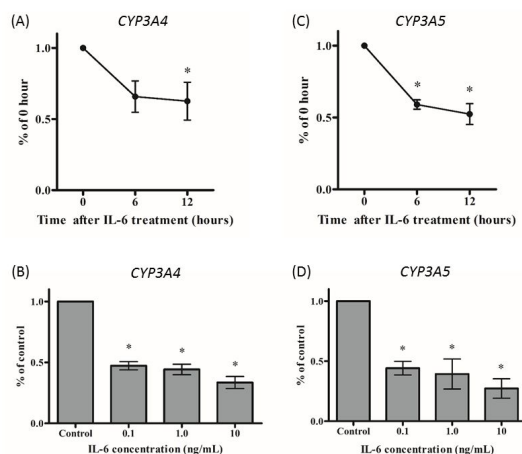


図 2 HepG2 細胞における IL-6 暴露による CYP3A4 および CYP3A5 mRNA 発現量の変化 (A), (B): CYP3A4、(C), (D): CYP3A5、平均値 ± 標準誤差 (n = 3)。*: one-way ANOVA post hoc Tukey's multiple comparison test: p<0.05 (vs 0 hour or control)

以上の結果より、腎移植術後早期に CYP3A5 の遺伝子型が PM の患者では、タクロリムスの血中濃度が一過性に上昇することが明らかとなり、その要因として IL-6 を介した CYP3A4 発現量の低下が関与している可能性が示唆された。本研究成果は、腎移植施行患者におけるタクロリムスの体内動態の個人差を解明する上で、重要な情報を提供するものと考えられる。一方で、本研究における検討からは、臓器移植患者における免疫抑制薬の体内動態の個人差に有意な影響を及ぼす miRNA を同定することができなかった。今後、血中 miRNA 発現変動と免疫抑制薬の血中濃度との関連性についてさらなる検討を進め、miRNA を指標とした個別化薬物療法の実現に向けたエビデンス構築を継続して行う必要があると考える。

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 14 件)

Ikemura K, Oshima K, Enokiya T, Okamoto A, Oda H, Mizuno T, Ishinaga H, Muraki Y, Iwamoto T, Takeuchi K, Katayama N, Okuda M. Co-administration of proton pump inhibitors ameliorates nephrotoxicity in patients receiving chemotherapy with cisplatin and fluorouracil: a retrospective cohort study. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 査読有, 79(5):943-949.2017, DOI:10.1007/s00280-017-3296-7

Kato H, Usui M, Muraki Y, Tanemura A,

k, Kuriyama N, Azumi Y, Kishiwada M, Mizuno S, Sakurai H, Okuda M, Nakatani K, Isaji S. Long-term influence of CYP3A5 gene polymorphism on pharmacokinetics of tacrolimus and patient outcome after living donor liver transplantation. *Transplantation Proceedings*. 査読有, 48(4):1087-1094. 2016, DOI: 10.1016/j.transproceed.2016.02.012.

Ikemura K, Hamada Y, Kaya C, Enokiya T, Muraki Y, Nakahara H, Fujimoto H, Kobayashi T, Iwamoto T, Okuda M. Lansoprazole exacerbates pemetrexed-mediated hematologic toxicity by competitive inhibition of renal basolateral human organic anion transporter 3. *Drug Metabolism and Disposition*. 査読有, 44(10):1543-1549. 2016, DOI:10.1124/dmd.116.070722

Iwamoto T, Monma F, Fujieda A, Nakatani K, Gayle AA, Nobori T, Katayama N, Okuda M. Effect of Genetic Polymorphism of CYP3A5 and CYP2C19 and Concomitant Use of Voriconazole on Blood Tacrolimus Concentration in Patients Receiving Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Therapeutic Drug Monitoring*. 査読有, 37(5):581-588. 2015, DOI: 10.1097/FTD.0000000000000182

[学会発表](計 13 件)

Ikemura K, Hamada Y, Kaya C, Enokiya T, Muraki Y, Nakahara H, Fujimoto H, Kobayashi T, Iwamoto T, Okuda M. Lansoprazole exacerbates pemetrexed-mediated hematological toxicity by competitive inhibition of renal basolateral human organic anion transporter 3. 2016 AAPS ANNUAL MEETING AND EXPOSITION, 2016 年 11 月 13 日 ~ 17 日, Denver (USA)

榎屋友幸, 西川晃平, 村木優一, 岩本卓也, 杉村芳樹, 奥田真弘. 生体腎移植術後患者のタクロリムス及びミコフェノール酸の薬物投与設計に関する研究、2016 年 11 月 26 日 ~ 27 日、東京薬科大学 (東京都八王子市)

榎屋友幸, 池村健治, 濱田裕悟, 村木優一, 岩本卓也, 西川晃平, 杉村芳樹, 奥田真弘. 腎移植術後早期のタクロリムス血中濃度の一過性上昇と CYP3A5 遺伝子多型との関連、2016 年 5 月 28 日 ~ 29 日、

栃木県総合文化センター（栃木県宇都宮市）

柳田航平、池村健治、川寄達也、岩本卓也、鍋倉智裕、奥田真弘、潰瘍性大腸炎ラットにおけるタクロリムスの経口吸収増加とその要因、日本薬学会第135年会、2015年3月26～28日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

池村健治、岩本卓也、奥田真弘、腸管薬物トランスポータの発現調節機構にmicroRNAの役割、第9回トランスポーター研究会、2014年6月14～15日、名古屋市立大学薬学部（愛知県名古屋市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 真弘 (OKUDA, Masahiro)
三重大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：70252426

(2) 研究分担者

岩本 卓也 (IWAMOTO, Takuya)
三重大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：30447867

池村 健治 (IKEMURA, Kenji)
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70513935

村木 優一 (MURAKI, Yuichi)
三重大学・医学部附属病院・副薬剤部長
研究者番号：50571452

伊佐地 秀司 (ISAJI, Syuji)
三重大学・医学系研究科・教授
研究者番号：70176121

(3) 研究協力者

平松 駿一 (HIRAMATSU, Shunichi)

濱田 裕悟 (HAMADA, Yugo)