

グルクロン酸抱合を主たる代謝経路とする

薬物の体内動態の個体差に関する研究

学位論文内容の要旨

【序論】一般に経口投与された薬物は、小腸から吸収された後、主として肝臓で代謝される。代謝反応は、第Ⅰ相反応（酸化・還元・加水分解）と第Ⅱ相反応（抱合反応）に分類される。この第Ⅰ相反応で主要な役割を担うチトクロム P450 (CYP) には多くの遺伝子多型が存在することが知られており、この多型性が薬物体内動態の人種差や個人差の要因となることが数多く報告されている。一方、薬物の中には第Ⅰ相反応を受けずに直接抱合反応を受けるものも存在する。このような薬物では、抱合酵素活性の個体差がその薬物動態に影響する可能性が考えられる。そこで、本研究では、UGT によって代謝される薬物の中から α ・ β 遮断薬カルベジロールと免疫抑制薬ミコフェノール酸 (MPA) を対象として、体内動態変動に及ぼす UGT 活性の個体差の影響を明らかにする目的で種々検討した。

【結果・考察】

Ⅰ カルベジロール

1) グルクロン酸抱合活性とカルベジロールの AUC の関係

北海道大学病院循環器科に入院中でカルベジロールを服用中の患者 40 名を対象として、経時的に静脈血を採取し、カルベジロール及びその抱合体の血漿中濃度を測定したところ、個体間変動が著しいことが明らかとなった。そこで、この変動の要因が UGT 活性の個体差によるものなのか否かを検討するために、抱合能 (MI) を“(グルクロン酸抱合体 AUC/未変化体 AUC) × クレアチニンクリアランス (Cc)”と定義し、低 AUC 群と高 AUC 群の間で比較したところ、高 AUC 群は低 AUC 群に比較して抱合能が低下していることが明らかとなった。

カルベジロールは、CYP2D6 および UGT1A1、UGT2B4、UGT2B7 によって代謝されることが報告されていることから、これらの遺伝子多型を診断し、MI 値によって群分けした低抱合能群と高抱合能群の間の多型頻度に差が認められるかを検討した。その結果、UGT1A1*6、UGT2B7*3、CYP2D6*10 において低抱合能群で有意にアレル頻度が高く、また CYP2D6*5 においては有意ではないものの同様に低抱合能群でアレル頻度が高い傾向が認められた。以上の結果から、これら遺伝子多型によってカルベジロールの抱合能が低下することが示唆された。

2) Recombinant UGT を用いた光学異性体選択的代謝と変異アレルの影響評価

UGT1A1 と UGT2B7 の遺伝子多型がカルベジロールの抱合能に影響を与えることが示唆されたことから、変異を導入した Recombinant UGT を作製し機能解析を行った。また、各 UGT 分子種において光学異性体選択的代謝についても併せて検討した。UGT1A1 においては、S-カルベジロールよりも R-カルベジロールの方が、代謝速度が非常に速く、R-カ

ルベジロール選択的な代謝が認められた。また、*UGT1A1*6* (G71R) では代謝効率 V_{max}/K_m が Wild type の 20.6% にまで低下した。一方、*UGT2B7* においては、*UGT1A1* とは対照的に S-カルベジロール選択的な代謝が認められた。また、*UGT2B7*2* (H268Y) および *UGT2B7*3* (A71S) では V_{max}/K_m がそれぞれ 22.8%、50.6% にまで低下した。

3) 母集団薬物動態解析

次に *in vivo* においてこれらの多型がクリアランスに及ぼす影響を母集団薬物動態解析の手法を用いて検討した。1 次吸収 1-コンパートメントモデルを用い、CYP2D6 および各 UGT 分子種の変異アレルの有無をパラメータとして変数増加法によりクリアランスに与える影響を評価した。その結果、*UGT1A1*6*、*UGT2B7*2* では有意な影響は認められなかった。一方、*CYP2D6* に多型が存在するとクリアランスが 39% し、*UGT2B7*3* を有するとクリアランスが 37% 低下することが示された。

II ミコフェノール酸

a) MPA の AUC に及ぼすグルクロン酸抱合活性および UGTs の遺伝子多型の影響

北海道大学病院泌尿器科に入院中の腎移植患者でミコフェノール酸モフェチル (MPA のプロドラッグ) を服用中の 43 名を対象として、経時的に静脈血を採取し、MPA とその主要代謝物であるフェノール性水酸基グルクロン酸抱合体 (MPAG) 濃度を測定した。AUC₀₋₁₂ の大小で 2 群に分け、MI 値を比較したところ、高 AUC 群において MI 値が低い傾向にあったが有意な差は認められなかった。また、MPA は主として *UGT1A9* および *UGT1A8* で代謝されることから、*UGT1A9* の遺伝子診断を行ったところ、43 名全患者から多型は検出されなかった。また、*UGT1A8* に関しては、AUC が高く MI の低いものから順に 15 名に絞って、同様に遺伝子診断を行った結果、A195C (アレル頻度 0.33)、C518G (アレル頻度 0.53) の変異が検出された。しかしながら、A195C は 1 例のヘテロのみと頻度が低く、C518G は既報のアジア人におけるアレル頻度 (0.47) と差が認められなかったことから、これらの多型から MPA の体内動態個体間変動を説明するのは難しいことが示唆された。

b) UGT 以外の MPA 体内動態個体間変動要因の探索

MPA は MPAG に代謝された後、MRP2 によって胆汁中へ排泄されたのち脱抱合され、腸肝循環することが知られている。この MPAG の体内動態には種差があり、ヒトでは MPAG の 90% が尿中に排泄されるのに対し、ラットでは 80% が胆汁中に排泄される。この要因として、MRP2 の MPAG に対する親和性の違いにより胆汁排泄量が異なることや、アニオン性物質である MPAG がヒト腎において hOAT1、hOAT3 に能動輸送されている可能性などが挙げられる。MPAG は腸肝循環により再吸収され MPA の AUC 増大にも影響を与えることから、この種差の要因を明らかにすることは、ヒトにおける個体間変動の要因解明につながるものと考えられる。そこで、MPAG が hOAT1、hOAT3 によって輸送される否かおよびラットとヒト MRP2 の親和性の違いを検証した。

まず、アフリカツメガエル卵母細胞に hOATs を発現させて MPAG の取り込みを測定したところ、hOAT1 ではコントロールに比較して有意な取り込みは認められなかったが、hOAT3 ではわずかながら有意な取り込みが認められた。また、MRP2 発現反転膜小胞を用いて MRP2 の典型的基質である PAH の取り込みに対する MPAG の阻害実験を行った。その結果、ヒトおよびラット間で阻害効果に違いが認められ、IC₅₀ はそれぞれ 1036.8 μ M、286.2 μ M であり、ラット Mrp2 の方がヒト MRP2 よりも親和性が高いことが示された。

【まとめ】カルベジロール血漿中濃度の個体間変動要因として、これまで報告されてきた CYP2D6 だけでなく、*UGT1A1* および *UGT2B7* の遺伝子多型や異なる光学異性体選択性が関係することが明らかとなった。一方、MPA では血漿中濃度の個体間変動は、主たる代謝酵素である UGTs の遺伝子多型では説明できず、hMRP2 や hOAT3 の輸送活性の個体差が影響する可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	井	関	健
副査	教授	原	島	秀吉
副査	准教授	菅	原	満
副査	講師	平	野	剛

学位論文題名

グルクロン酸抱合を主たる代謝経路とする 薬物の体内動態の個体差に関する研究

【研究の概要】

代謝反応は、第Ⅰ相反応（酸化・還元・加水分解）と第Ⅱ相反応（抱合反応）に分類される。この第Ⅰ相反応で主要な役割を担うチトクロム P450（CYP）には多くの遺伝子多型が存在することが知られており、この多型性が薬物体内動態の人種差や個人差の要因となることが数多く報告されている。一方、薬物の中には第Ⅰ相反応を受けずに直接抱合反応を受けるものも存在する。このような薬物では、抱合酵素活性の個体差がその薬物動態に影響する可能性が考えられる。そこで、本研究では、UGT によって代謝される薬物の中から α ・ β 遮断薬カルベジロールと免疫抑制薬ミコフェノール酸（MPA）を対象として、体内動態変動に及ぼす UGT 活性の個体差の影響を明らかにすることを目的とした。

I カルベジロール

北海道大学病院循環器科に入院中でカルベジロールを服用中の患者 40 名を対象として、カルベジロール及びその抱合体の血漿中濃度を測定したところ、著しい個体間変動が認められ、この要因として抱合能の個体差が関与していることを見いだした。カルベジロールは、CYP2D6 および UGT1A1、UGT2B4、UGT2B7 によって代謝されることが報告されていることから、これらの遺伝子多型を診断し、低抱合能群と高抱合能群の間の多型頻度に差が認められるかを検討したところ、UGT1A1*6、UGT2B7*3、CYP2D6*10 において低抱合能群で有意にアレル頻度が高く、また CYP2D6*5 においては有意ではないものの同様に低抱合能群でアレル頻度が高い傾向が認められ、これら遺伝子多型によってカルベジロールの抱合能が低下することが示唆された。

そこで、UGT1A1 と UGT2B7 に関して、変異を導入した Recombinant UGT を作製し機能解析を行った。また、各 UGT 分子種において光学異性体選択的代謝についても併せて検討した。UGT1A1 においては、R-カルベジロール選択的、UGT2B7 においては、S-カルベジロール選択的に代謝されることを明らかにした。また、UGT1A1*6（G71R）では代謝効率 V_{max}/K_m が Wild type の 20.6%に

まで、UGT2B7*2 (H268Y) および UGT2B7*3 (A71S) では V_{max}/K_m がそれぞれ 22.8%、50.6%まで低下することを明らかにした。

次に *in vivo* においてこれらの多型がクリアランスに及ぼす影響を母集団薬物動態解析の手法を用いて検討したところ、UGT1A1*6、UGT2B7*2 では有意な影響は認められなかった。一方、CYP2D6 に多型が存在するとクリアランスが 39%し、UGT2B7*3 を有するとクリアランスが 37%低下することが示された。

II ミコフェノール酸

北海道大学病院泌尿器科に入院中の腎移植患者でミコフェノール酸モフェチル (MPA のプロドラッグ) を服用中の 43 名を対象として、MPA とその主要代謝物であるフェノール性水酸基グルクロン酸抱合体 (MPAG) の血漿中濃度を測定した。AUC₀₋₁₂ の大小で 2 群に分け、抱合能を比較したところ、高 AUC 群において抱合能が低い傾向にあったが有意な差は認められなかった。また、MPA は主として UGT1A9 および UGT1A8 で代謝されることから、UGT1A9 の遺伝子診断を行ったところ、43 名全患者から多型は検出されなかった。また、UGT1A8 に関しては、AUC が高く抱合能の低いものから順に 15 名に絞って、同様に遺伝子診断を行った結果、A195C (アレル頻度 0.33)、C518G (アレル頻度 0.53) の変異が検出された。しかしながら、A195C は 1 例のヘテロのみと頻度が低く、C518G は既報のアジア人におけるアレル頻度 (0.47) と差が認められなかったことから、これらの多型から MPA の体内動態個体間変動を説明するのは難しいことが示唆された。

MPA は MPAG に代謝された後、MRP2 によって胆汁中へ排泄されたのち脱抱合され、腸肝循環することが知られている。この MPAG の体内動態には種差があり、ヒトでは MPAG の 90%が尿中に排泄されるのに対し、ラットでは 80%が胆汁中に排泄される。この要因として、MRP2 の MPAG に対する親和性の違いにより胆汁排泄量が異なることや、アニオン性物質である MPAG がヒト腎において hOAT1、hOAT3 に能動輸送されている可能性などが挙げられる。MPAG は腸肝循環により再吸収され MPA の AUC 増大にも影響を与えることから、この種差の要因を明らかにすることは、ヒトにおける個体間変動の要因解明につながるものと考えられる。そこで、MPAG が hOAT1、hOAT3 によって輸送される否かおよびラットとヒト MRP2 の親和性の違いを検証した。

まず、アフリカツメガエル卵母細胞に hOATs を発現させて MPAG の取り込みを測定したところ、hOAT1 ではコントロールに比較して有意な取り込みは認められなかったが、hOAT3 ではわずかながら有意な取り込みが認められた。また、MRP2 発現反転膜小胞を用いて MRP2 の典型的基質である PAH の取り込みに対する MPAG の阻害実験を行った結果、ヒトおよびラット間で阻害効果に違いが認められ、IC₅₀ はそれぞれ 1036.8 μ M、286.2 μ M であり、ラット Mrp2の方がヒト MRP2 よりも親和性が高いことを示した。これらのことから、MPAG の排泄に係わる hMRP2 や hOAT3 の活性の違いが MPA 体内動態の個体間変動の要因になり得ることを見いだした。これらの結果を通して、薬物の個体間変動は、代謝酵素だけでなく薬物の動態に関与する輸送担体など他の機能蛋白質の影響を同時に考慮する必要があることを示した。

【審査の結果】

カルベジロール血漿中濃度の個体間変動要因として、これまで報告されてきた CYP2D6 だけでなく、UGT1A1 および UGT2B7 の遺伝子多型や異なる光学異性体選択性が関係することを明らかにした。さらに、母集団薬物動態解析の手法を用い、これら遺伝子多型の影響を薬物クリアラン

スの低下率を算出した。一方、MPA では血漿中濃度の個体間変動は、主たる代謝酵素である UGTs の遺伝子多型では説明できず、hMRP2 や hOAT3 の輸送活性の個体差が影響する可能性を見いだした。これらの結果は、今後個別化医療の実践のための有用な知見になるものと期待される。また、論文発表会および口頭試問における質疑応答には、適切に回答しており、関連分野における専門知識は十分にあると認めた。以上の観点から本論文『グルクロン酸抱合を主たる代謝経路とする薬物の体内動態の個体差に関する研究』に含まれる研究成果は優れており、博士 (薬学) の学位を受けるに十分値するものと判定した。