

論文題名 抗がん剤による肝 CYP2C および CYP3A 活性の変動を介した薬物相互作用機序の解明	
氏 名 福野 修平	学籍番号若しくは 所 属 機 関 名 大阪大谷大学薬学部
主 論 文 1. <u>Fukuno S</u> , Nagai K, Kasahara K, Mizobata Y, Omotani S, Hatsuda Y, Myotoku M, Konishi H. Altered tolbutamide pharmacokinetics by a decrease in hepatic expression of CYP2C6/11 in rats pretreated with 5-fluorouracil. <i>Xenobiotica</i> , 2018; 48 :53-59. 2. <u>Fukuno S</u> , Nagai K, Horii A, Yamamoto K, Konishi H. Pharmacokinetics and metabolic elimination of tolbutamide in female rats: Comparison with male rats. <i>Biopharm Drug Dispos</i> , 2018; 39 :321-327. 3. <u>Fukuno S</u> , Nagai K, Yamamoto K, Tanimura T, Nabe T, Konishi H. Pharmacokinetic interference of doxorubicin with tolbutamide due to reduced metabolic clearance with increased serum unbound fraction in rats. <i>Biopharm Drug Dispos</i> , 2019; 40 :225-233. 4. <u>Fukuno S</u> , Nagai K, Fujiike M, Sasaki Y, Konishi H. Conflicting alterations in hepatic expression of CYP3A and enzyme kinetics in rats exposed to 5-fluorouracil: relevance to pharmacokinetics of midazolam. <i>Xenobiotica</i> , 2019; 49 :1470-1477.	
要 旨 がん治療戦略の 1 つである化学療法では、治療効果の増強や副作用の軽減を目的とする多剤併用療法が一般的になっており、合併症に対する薬剤を併用している機会も少なくない。そのため、化学療法を実施するにあたり、治療の成否を左右する薬物相互作用発現には特段の注意を要する。併用薬に起因する相互作用の他に、抗がん剤が併用薬の体内動態を変動させることで治療に悪影響を及ぼした症例が数多く報告されている。抗がん剤との併用で有害事象の発因とされた医薬品の多くは肝臓のシトクロム P450 (CYP) によって代謝を受けて体外に排泄されるため、抗がん剤が CYP 活性を変動させ、それによる併用薬の体内動態変動が薬物相互作用発現の機序と推定されているが、詳細は明らかとされていない。実験動物を用いた過去の研究では、抗がん剤投与が肝臓の CYP 発現量やその活性に影響を与えることが報告されている。しかし、これらの結果は必ずしも臨床報告と一致しているわけではなく、さらに、医療現場における薬物動態学的相互作用を考える上で、抗がん剤の影響を CYP 発現量やその活性の増減のみで説明することは困難である。このように、臨床研究と基礎研究で得られた知見の整合性の観点から明らかにすべき疑問は多数残されている。 本研究では、臨床で生じ得る疑問を解明し、抗がん剤による薬物相互作用機序を明らかとすることを目的として、臨床研究等から抽出された 3 つの事例に着目し、ラットモデルを用いて抗がん剤が CYP を介して引き起こす相互作用の有無とその発現メカニズムを薬物動態学および分子生物学的な視点から検証した。 第一章 5-FU 投与による CYP2C 基質薬物体内動態変動メカニズムの解明 臨床において、抗がん剤フルオロウラシル (5-FU) やそのプロドラッグを併用することで抗てんかん薬フェニトインや抗凝固薬ワルファリンの血中濃度上昇に伴う有害事象が発現した症例が複数報告されている。これらの併用薬は主に肝臓の CYP2C で代謝されるため、5-FU は肝臓の CYP2C 活性を低下させると推定されているが、ヒト肝 CYP2C 活性に対する直接的な阻害作用はないと報告されており、詳細な機序は未だ不明である。一方、ラットを用いた研究では、5-FU 投与により肝 CYP2C11 タンパク発現量が低下すると報告されているが、それを裏付ける	

CYP2C 遺伝子発現量に関する報告はなく、CYP 遺伝子発現量の変動と併用薬の体内動態変動との整合性の有無も検証されていない。そこで本章では、5-FU 投与による典型的な CYP2C 基質薬物トルブタミド (TB) のラット体内動態変動の有無とその変動メカニズムを検証した。

5-FU (120 mg/kg, i.p.) 投与 4 日後に TB (10 mg/kg) を静脈内投与し、TB の体内動態変動の有無を検討したところ、5-FU 投与ラットの TB 血中濃度推移は対照群と比較して高値で推移し、その全身クリアランス (CL_{tot}) は有意に低下した。一方、定常状態の分布容積に影響は認めなかった。そのため、本モデルは臨床で推定されている 5-FU による CYP2C 活性低下の機序の一端を解明する上で有用なモデルと考えられた。なお、肝障害は体内からの薬物の消失を遅延させる可能性があるため、5-FU 投与 4 日後の血清 ALT および AST 活性や肝組織染色像を評価した結果、肝臓に器質的な異常は生じていないことが示唆された。次に、5-FU 投与 4 日後のラット肝ミクロソームにおける TB 水酸化活性を調べたところ、対照群と比較して有意な低値を示した。これは、5-FU 投与によって TB の CL_{tot} が低下した結果を支持するものであった。また、NADPH 存在下で 5-FU を肝ミクロソーム反応液に直接添加しても TB 水酸化活性に影響を及ぼさず、5-FU はラット肝 CYP2C に対して競合的阻害または mechanism-based inhibition (MBI) を引き起こさないことが示唆された。5-FU による CYP2C 活性低下の機序に新たな知見を得るため、リアルタイム PCR 法を用いて 5-FU がラット肝 CYP2C の遺伝子発現量に及ぼす影響について検討した結果、5-FU は CYP2C6 および CYP2C11 の mRNA 発現量をいずれも有意に減少させた。なお、過去に報告されていない肝 CYP2C6 タンパク発現量に及ぼす 5-FU の影響はウェスタンブロット法で検証し、5-FU 投与によって CYP2C6 タンパク発現量は有意に減少することが確認された。以上より、5-FU が肝 CYP2C 遺伝子発現量を低下させることで肝 CYP2C タンパク発現量は減少すると考えられ、その結果として TB 代謝クリアランスの低下をもたらし、TB の体内動態を変動させることが示唆された。

本章で認められた TB 代謝クリアランスの低下は、5-FU 投与による CYP2C 活性低下が原因と考えられる薬物相互作用を基礎的観点から裏付ける重要な知見と考えられ、この相互作用は肝臓の CYP2C に関連する mRNA 転写の抑制または安定性の低下に起因することが示唆された。

第二章 5-FU 投与が CYP3A 基質薬物の肝代謝活性および体内動態に及ぼす影響

第一章の結果より、5-FU は肝臓の CYP 発現量を変動させることで併用薬と薬物相互作用を引き起こす可能性が示された。CYP3A は CYP2C と同様に、ヒトにおいて多くの医薬品代謝に関与する重要な CYP サブファミリーであるが、臨床において 5-FU と CYP3A 基質薬物との相互作用に関する報告はほとんどない。一方、ラットを用いた過去の研究では 5-FU 単回投与の 2 日後にラット肝 CYP3A タンパク発現量が増加すると報告されているが、CYP3A 活性は顕著な増加を示しておらず、増加した CYP3A 発現量とその代謝活性が合致しない理由は未だ不明である。第二章では、5-FU 投与が肝 CYP3A 活性および併用薬の体内動態に及ぼす影響の有無を明らかにするため、5-FU 投与 2 日後におけるラット肝 CYP3A タンパク発現量およびその活性ならびに CYP3A 基質薬物の体内動態に及ぼす影響について典型的な CYP3A 基質薬物であるミダゾラム (MDZ) を用いて検討した。

5-FU (120 mg/kg, i.p.) 投与 2 日後のラットより肝臓を摘出し、CYP3A タンパク発現量をウェスタンブロット法を用いて調べた結果、肝 CYP3A1/3A23 タンパク発現量に有意な変化は認められなかったが、CYP3A2 タンパク発現量は対照群と比較して顕著な増加が認められた。次に、5-FU 投与 2 日後の肝ミクロソームにおける MDZ 水酸化代謝能を調べたところ、5-FU 投与群の MDZ 4'-および 1'-水酸化反応は、いずれにおいても最大反応速度 (V_{max}) の増加とともにミカエリス定数 (K_m) に有意な上昇が認められ、肝固有クリアランスを反映する V_{max}/K_m 値に大きな変化は認められなかった。5-FU 投与により MDZ 水酸化反応の V_{max} 値が増加した結果は、肝 CYP3A2 タンパク発現量が増加した結果と一致するものと考えられた。一方、NADPH 存在下で 5-FU をミクロソーム反応液に直接添加したところ MDZ 水酸化活性の阻害作用は示さなかったこと、5-FU 投与群と対照群との間で CYP3A 阻害剤存在下での MDZ 水酸化代謝活性低下率に差異が認められたことから、 K_m 値が上昇した理由の一つとして、5-FU 投与により常在型の CYP3A タンパクとは酵素触媒機能が異なる CYP3A 分子が生合成されている可能性が考えられた。また、5-FU 投与 2 日後に MDZ (5 mg/kg) を静脈内投与し、MDZ 体内動態変動の有無を検討した結果、いずれの体内動態パラメータにおいても有意な変化は認められなかった。この

結果は、5-FU 投与ラットの肝 CYP3A の固有活性 (V_{\max}/K_m) は変化しないとの知見と一致していた。以上より、5-FU 単回投与はラット肝 CYP3A2 発現量を増加させ、肝臓における高い基質濃度条件下での MDZ 代謝活性を増加させることが示された。しかし、5-FU は CYP3A 誘導作用とともに MDZ に対する CYP3A の親和性を低下させるため、MDZ 代謝活性への作用が相殺され、結果として MDZ の体内動態に影響を及ぼさないことが示唆された。

本章の結果より、5-FU の CYP3A 誘導作用とその代謝活性が連動しなかった理由の一つとして、5-FU 投与により基質薬物に対する CYP3A の親和性が低下していることが示唆された。本章で得られた知見は、臨床において 5-FU が CYP3A 基質薬物の体内動態を変動させることを示した報告が極めて少ないことを裏付ける貴重なものと考えられた。

第三章 DOX 投与による CYP2C 基質薬物体内動態変動メカニズムの解明

アントラサイクリン系抗がん剤であるドキソルビシン (DOX) も CYP の発現量に影響を与える医薬品の 1 つである。臨床において、DOX はフェニトインの血中濃度を低下させるため代謝クリアランスを増加させるとの見解や、CYP2C の基質であるロサルタンの代謝物排泄率に低下が認められたため CYP2C 活性を低下させるとの見解があり、DOX が肝 CYP2C 活性に及ぼす影響については情報が交錯している。第三章では、DOX による CYP2C を介した薬物動態学的相互作用の有無を明らかとするため、DOX 投与ラットにおける肝 CYP2C タンパク発現量およびその代謝活性を調べるとともに、これらの変動が CYP2C 基質薬物の体内動態変動と連動するかどうか検証した。

DOX (15 mg/kg, i.p.) 投与 1 日後または 4 日後のラットより肝臓を摘出し、CYP2C タンパク発現量を調べた結果、DOX 投与は CYP2C6 タンパク発現量に影響を及ぼさなかったが、投与 1 日後において CYP2C11 タンパク発現量を有意に減少させ、4 日後でさらに顕著な抑制作用を示した。次に、TB 4-水酸化反応に複数の CYP 分子種が関与するかどうかを調べるため、2 種の酵素反応速度モデル式を比較したところ、親和性が近似する酵素のみが寄与すると仮定することで酵素反応を速度論的に説明できることが示された。選択したモデル式を用いて TB 4-水酸化反応を解析したところ、CYP2C11 タンパク発現量の変化と連動し、DOX 投与は K_m 値に影響を及ぼさずに V_{\max} 値を有意に低下させた。そこで、DOX が TB (10 mg/kg, i.v.) のラット体内動態に及ぼす影響について検討したところ、DOX 投与 4 日後における血清中 TB 濃度は対照群と比較して低値で推移し、 CL_{tot} は有意な高値を示した。一方、DOX 投与により血清アルブミン濃度の低下とともに TB の血清タンパク非結合率 (f_u) の上昇が認められ、TB 投与 1 時間後の血清中遊離型 TB 濃度は対照群と比べて高値を示した。TB の肝固有クリアランスの指標として算出した CL_{tot}/f_u 値は DOX 投与により有意に減少し、これは DOX 投与後の肝ミクロソームにおいて TB 4-水酸化反応の V_{\max}/K_m 値が低値を示した結果と一致するものと考えられた。以上より、DOX 投与は肝 CYP2C11 発現量を低下させ、肝臓の TB 代謝活性を低下させることが示された。さらに、DOX 投与後における CYP2C 活性の低下は、血清中 TB の総濃度には反映されず、その遊離型濃度の体内動態に反映されることが示唆された。

本章で得られた知見は、DOX 投与によって肝 CYP2C 活性は低下するとの臨床報告を支持するものである。DOX 投与は併用薬の代謝遅延をもたらすとともに、併用薬の血清タンパク結合率を大きく変動させる可能性があることを明らかとし、併用薬の血中総濃度を測定するのみでは、その遊離型濃度を誤って解釈する危険性があることを示すことができた。

本研究では、3 つの疑問を解明する上でそれぞれ貴重な知見を得ることができ、これらを通して抗がん剤による CYP を介した薬物相互作用機序の一端を明らかとすることができた。すなわち、抗がん剤による肝 CYP 発現量の変動特性は一樣ではなく薬剤や CYP 分子種によって異なる挙動を示すこと、抗がん剤投与後の CYP 代謝活性には基質薬物に対する親和性の変化も関与する可能性が示された。また、抗がん剤が原因となる薬物相互作用を薬物動態学的な側面から評価するためには、併用薬の血清タンパク結合率の変動にも留意する必要があることも明らかとした。本研究で得られた知見が、がん化学療法を実施する上で生じ得る臨床的疑問を解決するために活用されることを期待する。