

学位論文の内容の要旨

学位論文題目 ロサルタンの CYP2C8 阻害作用に関する研究

論文指導教授 戸 田 貴 大

学位申請者 向 祐 志



薬物間相互作用(DDI)は、薬物有害事象の原因のうち回避可能なものの1つである。シトクロム P450(CYPs)は多くの薬物の代謝に寄与しているため、CYPs を介した DDI の予測は安全な薬物治療の実践のために重要である。

アンジオテンシン II 受容体拮抗薬であるロサルタンは CYP2C8 および CYP2C9 に対する阻害作用を有し、50%阻害濃度(IC₅₀)はそれぞれ 12.9 および 39.5 μM と報告されている。ロサルタン内服後の最高血中遊離形濃度(C_{max,u})を用いた解析により、臨床用量のロサルタン内服による両 CYP 分子種を介した DDI のリスクは少ないと考えられている。しかし、ロサルタンをラットに経口投与すると、血中の約 20-40 倍高い濃度で肝臓に分布したという報告があることから、受動拡散による組織移行を仮定している C_{max,u}を用いた解析ではロサルタンの DDI リスクを過小評価している可能性がある。ロサルタンの CYP2C8 に対する IC₅₀は CYP2C9 よりも低いことに加え、CYP2C8 はパクリタキセルやアミオダロンなどのハイリスク薬の代謝に関与していることから、ロサルタンの CYP2C8 を介した *in vivo*での DDI リスクについて再評価する必要がある。

本研究では、リコンビナント CYP(rCYP)酵素を用いてパクリタキセル代謝阻害実験を行い、ロサルタンによる CYP2C8 の阻害形式と阻害定数(K_i)を推定し、*in vivo*での DDI リスクを評価した。また、rCYP 酵素よりも生体に近い条件であるヒト肝マイクロソーム(HLMs)を用いて、ロサルタンの CYP2C8 阻害作用を評価した。

1. ロサルタンの CYP2C8 阻害形式の検討及び DDI リスクの評価

ヒトリンパ芽球細胞発現系リコンビナント CYP2C8 (rCYP2C8) および同一発現系のコントロールミクロソームを用い、ロサルタンによるパクリタキセルの代謝阻害実験を行った。

Dixon plot および Cornish-Bowden plot の結果 (Fig. 1) から、ロサルタンの CYP2C8 阻害形式は競合阻害であると考えられた。また、Dixon plot より、 $K_i = 40.7 \mu\text{M}$ が得られた。

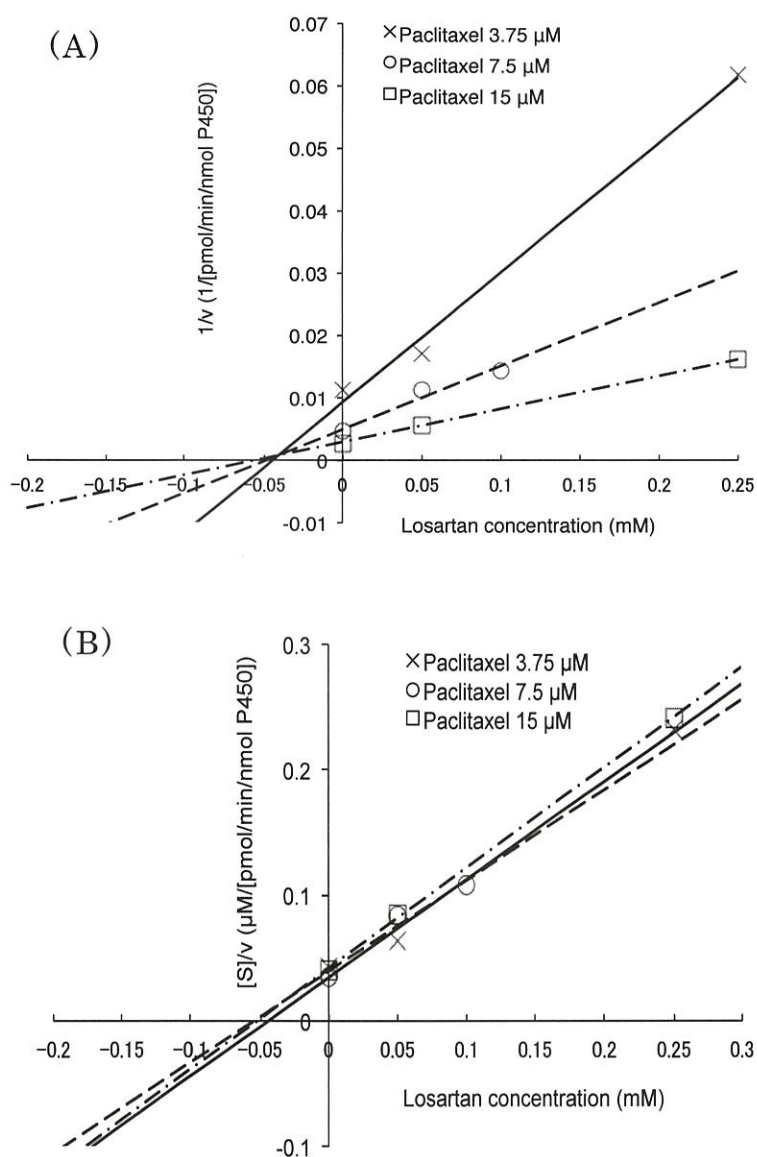


Fig. 1 Dixon plot (A) および Cornish-Bowden plot (B) ($n = 1-2$)

v : パクリタキセル代謝速度 (pmol/min/mg protein)

$[S]$: パクリタキセル濃度 (μM)

FDA の DDI ガイダンス(2012 年ドラフト版)に従い、R 値を用いて *in vivo* でのロサルタンの CYP2C8 を介した DDI リスクを評価した。R 値は阻害剤の併用による被相互作用薬の血中濃度-時間曲線下面積(AUC)の増加比を表す値であり、式 1 を用いて算出した。

$$R=1+\left(\frac{[I]_{in}}{K_i}\right) \quad \text{-(式 1)}$$

$[I]_{in}$ は、繰り返し経口投与後の薬物の肝流入部濃度（理論上の最高到達濃度）であり、消化管吸収が非常に速やかな薬物の吸収直後の肝動脈内薬物濃度と門脈内薬物濃度の合計に相当する(式 2)。

$$[I]_{in} = [I]_{av} + \left(\frac{D \times k_a \times F_a}{Q_h}\right) \quad \text{-(式 2)}$$

ここで、 $[I]_{av}$ は繰り返し経口投与後のロサルタンの定常状態平均血中濃度、D はロサルタンの投与量、 k_a は一次吸収速度定数、 F_a は消化管吸収率、 Q_h は肝血流量を表す。偽陰性の結果を避けるために、D はロサルタンの 1 日最大投与量である 100 mg とした。また、 k_a 、 F_a 、 Q_h にはそれぞれ 0.1 min^{-1} 、1.0 および 1610 mL/min を用いた。 $[I]_{av}$ は式 3 により算出した。

$$[I]_{av} = \left(\frac{D/\tau}{CL/F}\right) \quad \text{-(式 3)}$$

ここで、 τ はロサルタンの投与間隔、CL は全身クリアランス、F はバイオアベイラビリティを表す。ロサルタンは通常 1 日 1 回投与であるため、 τ として 24 hr を用いた。CL および F は、それぞれ文献値である 558.7 mL/min 、0.365 を用いた。式 3 で算出された定常状態平均血漿中濃度に血中/血漿中濃度(B/P)比を乗じて、全血中濃度に換算した結果、 $[I]_{av}$ は $0.052 \text{ }\mu\text{M}$ となった。この値を式 2 に代入し、 $[I]_{in} = 7.3 \text{ }\mu\text{M}$ を算出した。

$[I]_{in}$ および K_i の値を式 1 に代入し、 $R = 1.2$ を得た。FDA の DDI ガイダンスでは $R > 1.1$ を DDI リスク評価のカットオフ値として採用しているため、*in vivo* におけるロサルタンの CYP2C8 阻害作用は無視できないと判断した。

2. HLMs におけるロサルタン-パクリタキセル相互作用の検討

rCYP 酵素より生体に近い条件である HLMs を用いてロサルタンによるパクリタキセル代謝阻害実験を行った。HLMs はカロリンスカ研究所の倫理委員会による承認ならびに被験者から書面での同意を得た後、同研究所の Liver bank から提供を受けた。さらに CYP2C8 の活性低下型変異アレルである *CYP2C8*3* が DDI に及ぼす影響を検討するために、HLMs のうち *CYP2C8* 遺伝子型が異なる HL60 (*CYP2C8*1/*1*) および HL54 (*CYP2C8*1/*3*) の結果を比較した。HLMs においてパクリタキセルは CYP2C8 に加えて、CYP3A4 による代謝を受ける。ロサルタンが阻害する CYP 分子種を特定するために、CYP2C8 選択的阻害薬としてクエルセチンおよび CYP3A4 選択的阻害薬としてケトコナゾールとエリスロマイシンを用いた代謝阻害実験も行った。

各阻害薬のパクリタキセル代謝阻害率を Fig. 2 に示す。CYP 選択的阻害薬による代謝阻害率の結果から、HL60 では CYP3A4 がパクリタキセルの主代謝酵素であり、HL54 では CYP2C8 と CYP3A4 がほぼ同程度の割合でパクリタキセルの代謝に寄与していると考えられた。ロサルタンは HL60 および HL54 のいずれにおいてもパクリタキセル代謝を濃度依存的に阻害したため、ロサルタンは CYP2C8 および CYP3A4 の両分子種を阻害することが示唆された。

HL60 および HL54 におけるロサルタンの IC₅₀ [95%信頼区間] はそれぞれ 161 [128-203] μM、73 [42-127] μM と算出され、ロサルタン-パクリタキセルの DDI は *CYP2C8* 遺伝子型の影響を受ける可能性が示された。HLMs 中でロサルタンは主に CYP2C9 により EXP-3174 に代謝される。HL54 は *CYP2C9*1/*2* 遺伝子型を有しているため、*CYP2C9* 遺伝子変異に起因する EXP-3174 生成量の違いがロサルタンによるパクリタキセル代謝阻害作用の違いに関係している可能性がある。

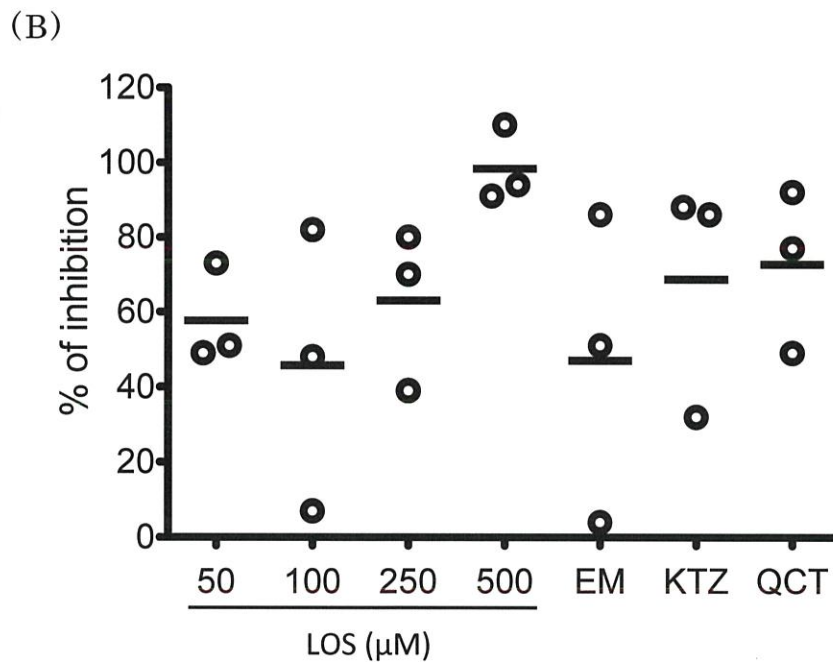
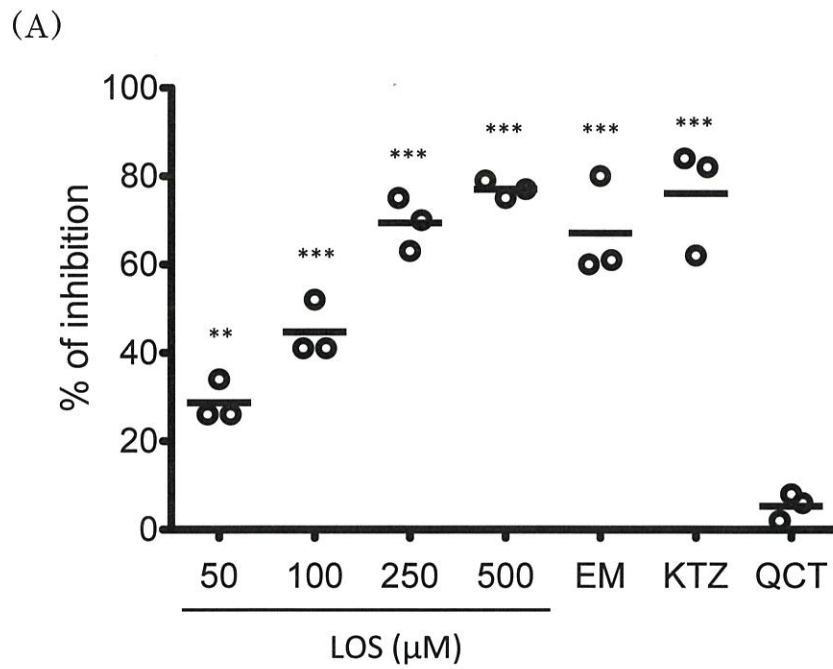


Fig. 2 HL60(A)および HL54(B)における各阻害薬のパクリタキセル代謝阻害率 (n = 3)

LOS: ロサルタン、EM: エリスロマイシン(100 μM)、
 KTZ: ケトコナゾール(1 μM)、QCT: クエルセチン(10 μM)

(A) **: P<0.01, ***: P<0.001 vs. QCT

(B) QCT と他の阻害薬のパクリタキセル代謝阻害作用に統計的な有意差は認められなかった。

3. CYP2C8 および CYP2C9 遺伝子型がロサルタン-パクリタキセル相互作用に及ぼす影響の検討

ロサルタン-パクリタキセルの DDI における CYP2C8 遺伝子型の影響を詳細に検討するために、カロリンスカ研究所から提供を受けた 7 つの HLMs (Table 1) を用いてロサルタンによるパクリタキセル代謝阻害実験を行った。また、CYP2C9 遺伝子変異に起因する EXP-3174 生成量の違いがロサルタンのパクリタキセル代謝阻害活性に影響を及ぼす可能性があるため、CYP2C8 によるパクリタキセルの代謝生成物である 6 α -hydroxypaclitaxel に加え、EXP-3174 の生成量を HPLC 法により測定した。

Table 1 使用した HLMs の特徴

HLMs	Genotype		CYP2C8 content (pmol/mg protein)
	CYP2C8	CYP2C9	
HL60	*1/*1	*1/*1	16.8
HL68	*1/*1	*1/*1	41.5
HL73	*1/*1	*1/*1	38.3
HL55	*1/*1	*1/*3	17.7
HL71	*1/*2	*1/*3	23.8
HL54	*1/*3	*1/*2	7.2
HL20	*3/*3	*2/*2	25.8

ロサルタンの添加濃度を 1-100 μ M とし、各 HLMs における CYP2C8 に対する IC₅₀ を算出した。本研究では基質であるパクリタキセルの濃度を K_m 値である 7.5 μ M としたため、K_i 値は IC₅₀/2 で算出した。得られた K_i 値ならびに 1. で得られた [I]_{in} (7.3 μ M) を式 1 に代入し、各 HLMs における R 値を算出した (Table 2)。また、EXP-3174 生成量から作成した Michaelis-Menten plot より得られた速度論的パラメータを Table 3 に示す。

Table 2 ロサルタンの CYP2C8 に対する IC₅₀、Ki および R 値

CYP2C8 genotype	HLMs	IC ₅₀ (μM) [95%CI]	Ki (μM)	R value
Pooled	Pooled	61.6 [51.6-73.6]	30.8	1.24
*1/*1	HL55	63.9 [55.5-73.6]	32.0	1.23
	HL60	76.6 [62.4-94.0]	38.3	1.19
	HL68	38.5 [34.2-43.3]	19.3	1.38
	HL73	56.6 [47.3-67.8]	28.3	1.26
*1/*2	HL71	76.3 [57.0-102.1]	38.2	1.19
*1/*3	HL54	40.0 [33.3-48.0]	20.0	1.37
*3/*3	HL20	66.1 [61.1-71.5]	33.1	1.22

95%CI: 95%信頼区間

Table 3 EXP-3174 生成に関する速度論的パラメータ

Enzyme kinetic parameters	Pooled	CYP2C9*1/*1			CYP2C9*1/*2	CYP2C9*2/*2	CYP2C9*1/*3	
	HLMs	HL60	HL68	HL73	HL54	HL20	HL55	HL71
Vmax (pmol/min/mg protein)	51.8 [49.0-54.5]	54.2 [51.4-57.0]	46.2 [43.7-48.7]	86.2 [80.6-91.9]	42.8 [39.6-46.1]	22.9 [21.9-24.0]	36.7 [34.9-38.5]	22.2 [19.1-25.3]
Km (μM)	9.9 [8.3-11.5]	7.5 [6.3-8.7]	6.1 [4.9-7.2]	6.0 [4.6-7.4]	7.1 [5.3-8.9]	5.6 [4.6-6.5]	7.2 [6.0-8.3]	4.7 [2.1-7.2]
Vmax/Km (μL/min/mg protein)	5.2	7.2	7.6	14.4	6.0	4.1	5.1	4.7

[]内は 95%信頼区間を示す

CYP2C8*1/*3 を有する HL54 におけるロサルタンの IC₅₀ は、HL68 を除くすべての HLMs よりも低い値を示した。しかし、CYP2C8*3/*3 を有する HL20 におけるロサルタンの IC₅₀ は、HL68 および HL54 を除くすべての HLMs と同程度の値であった。検討した HLMs のうち HL20 においてのみ、ロサルタンは 1 μM で有意な CYP2C8 阻害作用を示した (P<0.01)。HL20 は CYP2C9*2/*2 を発現しており、ロサルタンからの EXP-3174 生成に関して最も低い代謝固有クリアランス (Vmax/Km) を示したが、CYP2C9*1/*3 を有する HL71 と同程度の値で

あった。しかし、HL71 では HL20 と異なり、1 μ M のロサルタンは CYP2C8 活性に有意な影響を及ぼさなかった。また、HL71 における IC₅₀ は HL60 の次に高い値であった。これらの結果は、CYP2C9 遺伝子変異に伴うロサルタン代謝活性の低下が HLMs におけるロサルタンの CYP2C8 阻害作用に及ぼす影響は小さいことを示している。

R 値に関しては、HL68、HL73 及び HL54 で 1.25 以上の値を示した。このことは、ある要因を有するヒトではロサルタンが *in vivo* で弱い CYP2C8 阻害薬となる可能性を示している。しかし、その要因は CYP2C8 遺伝子型だけでは説明できないものであった。

結論

ロサルタンの分布特性を考慮し、肝流入部濃度を用いてロサルタンの CYP2C8 を介した DDI リスクを評価した結果、ロサルタンによる *in vivo* での CYP2C8 阻害作用は無視できないことが明らかとなった。また、ロサルタンによる CYP2C8 阻害作用の程度は個体間で異なり、*in vivo* で CYP2C8 に対する弱い競合型阻害薬となる可能性が示された。

これらの成果は、ロサルタンによる CYP2C8 を介した薬物間相互作用について新たな知見を提供するものであり、パクリタキセルやアミオダロンなどの CYP2C8 の基質となるハイリスク薬による薬物治療の安全性向上に寄与するものである。