

論文の内容の要旨

論文題目 薬物トランスポーターOATP1B3, MRP2の遺伝子変異による docetaxelが誘起する血液毒性の増強メカニズムの解明と in vivo トランスポーター機能プローブ薬の探索

氏名 山田 哲裕

【序論】

理化学研究所の中村祐輔先生らと所属する研究室との共同研究により、抗悪性腫瘍薬 docetaxel の重篤な副作用の1つである好中球減少症のリスクが、Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP)1B3, Multidrug Resistance associated Protein (MRP)2 それぞれ特定の遺伝子変異により上昇することが明らかとされた。OATP1B3 は、肝臓の血管側に選択的に発現する取り込みトランスポーターで、アニオン性化合物を中心として多様な基質を認識する。また、MRP2 は胆管側に発現する排泄トランスポーターで、OATP 類と似た基質認識性を示し、肝臓における基質の血管側から胆汁中への効率よい経細胞輸送を実現している。docetaxel は静脈内投与後、肝臓内に取り込まれた後に、主に CYP3A による代謝で消失し、未変化体での胆汁排泄はほとんど受けないことから肝臓に発現する MRP2 の影響は考えにくい。そこで私は、臨床事象を説明しうる仮説として、① docetaxel の肝取り込みは主に OATP1B3 によるものであり、その遺伝子変異による機能低下が docetaxel の体内からの消失遅延を招き、全身暴露が上昇した結果、血液毒性が重篤化した、②好中球あるいはその前駆細胞に発現する MRP2 は docetaxel を細胞内から能動的に排出しており、その遺伝子変異による機能低下の結果、血球細胞内の薬物の蓄積が増大し、血液毒性が重篤化した、と考えた(図)。さらに、臨床研究の結果発見された二つの遺伝子変異は、Intron 11 (OATP1B3)や 3'-非翻訳領域 (MRP2)に存在する一塩基置換であり、これら変異が直接の原因かどうかも含め、in vitro 実験による機能変化の実証が困難であり、これまでにこれら変異と臨床事象と

の関連についても報告がない。そこで本研究では、上記仮説の検証を進めると共に、docetaxel による好中球減少の程度を薬物動態の変動とリンクさせた数理モデルを基に、トランスポーターの機能変動が血液毒性のリスクに与える

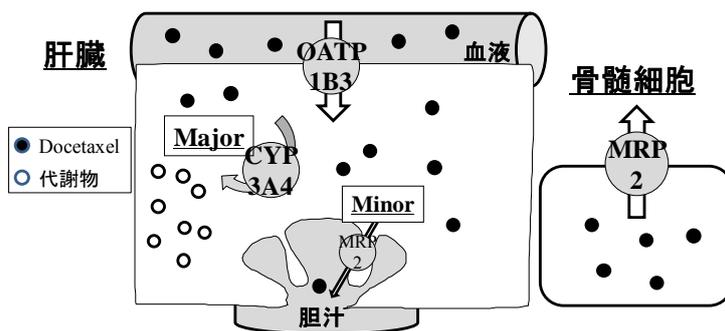


図. docetaxelの毒性発現におけるOATP1B3, MRP2の役割

影響をモンテカルロシミュレーションより考察した。また、トランスポーター機能の個人差は、遺伝的要因以外にも生み出されることから、ヒト in vivo において個々のトランスポーター機能を見積もることができるプローブ薬が切望されている。そこで、OATP1B3の機能を、ヒト in vivo で測定可能なプローブ薬の探索及び解析についても行った。

【方法・結果】

1. Docetaxel に起因する好中球減少症のリスクを決定付ける OATP1B3 の役割とプローブ薬を用いた遺伝子多型による OATP1B3 の機能変動の検証

ヒト肝臓の血管側膜に発現している各種 Solute Carrier (SLC)ファミリートランスポーター(OATP1B1, OATP1B3, OAT2B1, OAT2, NTCP, OCT1)を過剰発現させた HEK293 細胞を用いて、docetaxel の細胞内取り込みを観察したところ、OATP1B3 発現細胞においてのみ有意な取り込みが認められた。また、ヒト凍結肝細胞への docetaxel の取り込みに対して、OATP1B1, OATP1B3 の両方を阻害する Estradiol-17 β -glucuronide (EG)、および OATP1B1 を選択的に阻害する Estrone-3-sulfate (ES)の阻害効果を検討したところ、docetaxel の肝細胞への取り込みは、EG によって阻害されるが ES によっては阻害されないことを観察した。この結果からも、docetaxel のヒト肝臓への取り込みには OATP1B3 が主に寄与していることが示唆され、当初の仮説を支持する結果を得た。

これまでにアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 telmisartan が、OATP1B3 の選択的な基質となって肝取り込みされていることが in vitro 実験の結果から示唆されており、ヒト臨床において OATP1B3 の輸送機能をフェノタイプングできるプローブ基質となりうると考えられてきた。Telmisartan は、肝臓に OATP1B3 によって取り込まれた後、肝臓内で UDP-glucuronosyl transferase (UGT)によるグルクロン酸抱合を受けて胆汁排泄されることが考えられている。そこで、OATP1B3 をはじめとする一連の薬物トランスポーターおよび telmisartan の抱合代謝に関与する可能性がある UGTs のうち機能低下が明確に報告されている UGT1A1*28 について telmisartan の薬物動態との関連解析を行った。その結果、前述の docetaxel の臨床研究において有意な関連が認められた変異である OATP1B3 rs11045585 のヘテロ接合体において telmisartan の経口クリアランスは 70.5%に低下する傾向にあること(P=0.0832)、また、UGT1A1*28 のヘテロ接合体では、当初の予想とは反し、telmisartan の経口クリアランスが

175%に有意に上昇すること(P=0.0349)を明らかにした。

2. Docetaxel に起因する好中球減少症のリスクを決定付ける MRP2 の役割

MRP2 を過剰発現させた細胞において docetaxel による毒性および蓄積性が低下することを明らかにし、MRP2 が docetaxel を細胞外へと排出することで細胞毒性を緩和させる働きを担っていることを明らかにした。また次に、ラットより採取した骨髄細胞を用いて、G-CSF により促進されるコロニー形成に対して docetaxel の濃度依存的な阻害効果を観察したところ、対照群となる SD rat 由来の細胞に比べ、MRP2 を遺伝的に欠損するラット(Eisai Hyperbilirubinemic Rat (EHBR))から採取した細胞、もしくは MRP 阻害剤 MK571 を添加した細胞では、docetaxel の阻害効果の有意な増強が観察された。すなわち骨髄細胞において MRP2 が docetaxel の細胞毒性に対する防御に関与しており、その機能欠損や阻害が骨髄細胞における毒性を増強することが示唆され、当初の仮説を支持する結果を得た。

3. 好中球減少を定量的に予測する数理モデルを用いた OATP1B3, MRP2 遺伝子多型が副作用発現リスクに与える影響に関する考察

薬物動態・副作用発現両方を加味した、抗がん剤が引き起こす好中球減少症を定量的に表す数理モデルが過去に提唱されている。薬物動態、薬効（副作用）を決める個々の因子にはそれぞれ個体間変動があるが、数理モデル中においてはパラメータのばらつきとして考えることができる。そこで、過去に報告例のある docetaxel の好中球減少症を説明する PK/PD モデルを用いて、各パラメータのばらつきを考慮に入れたモンテカルロシミュレーションによる仮想的なヒトのパラメータセットを発生させ、好中球数の最低値を基に好中球減少症の重篤度の grade 判定を行った。毒性非発現群と grade3, 4 の好中球減少が発現した群とで分類した際の odds ratio は、前述の臨床試験の結果における患者数 15 名以上の遺伝子型の OATP1B3/MRP2 の遺伝子型がヘテロ/ヘテロ、野生型/ヘテロ、野生型/ホモにおいてそれぞれ 9.04, 3.72, 11.8 であった。一方、シミュレーションで、docetaxel の全身クリアランスを 80%にまで低下させた場合（OATP1B3 の機能低下を想定）、および docetaxel の最大の副作用発現の半分を示す血中濃度を表す定数を 66%にまで低下させた場合（MRP2 の機能低下を想定）について、各パラメータのばらつきを考慮してランダムに生成された 500 人分の仮想パラメータセットに基づきシミュレーションを行い、odds ratio をそれぞれ算出したところ、9.84, 3.10, 10.8 と臨床報告に近いリスクの上昇となった。

4. UGT1A1*28 による telmisartan の薬物動態の変動メカニズムの説明

前述した通り、予想と反して UGT1A1*28 変異保持者において、telmisartan の血漿中 AUC の低下が認められた。一方、telmisartan のグルクロン酸抱合に関わる分子種については未だ明らかにされていない。そこで、12 種類の UGT 分子種の発現マイクロソームを用いて telmisartan のグルクロン酸抱合速度を測定したところ、UGT1A1, 1A3, 1A7, 1A8, 1A9 が

telmisartan を基質とし、特に UGT1A3, 1A8 による代謝クリアランスが非常に大きいことが示された。一方、つい最近になってヒト肝臓サンプルにおいて、UGT1A1*28 変異保持者では、UGT1A3 の mRNA およびタンパクレベルにおいて発現量が有意に増加しているという報告がなされた。これらの結果より、UGT1A1*28 保持者における telmisartan のクリアランス上昇が、UGT1A3 の発現上昇に起因する可能性が高いと考えられ、現在、telmisartan の抱合代謝に関わる各分子種の定量的な寄与率を解析中である。

【総括】

本研究において私は、docetaxel によって引き起こされる好中球減少症に関連することが臨床研究により明確にされたトランスポーターの機能解析を通じ、遺伝子多型によって生じる OATP1B3, MRP2 の機能低下がどの程度副作用の発現リスクを高めるかに関して定量的な検討を行った。またさらに、ヒト *in vivo* で直接トランスポーターの機能を推定できるようなプローブ薬を探索する一環として、OATP1B3 選択的基質である telmisartan を用いた臨床試験を行うことで、先の遺伝子多型による OATP1B3 の機能低下の程度について併せて検討を行った。

まずトランスポーター発現細胞やヒト肝細胞を用いて、docetaxel の肝臓からの消失に寄与するトランスポーターの同定と OATP1B3 の寄与率について検討を行った結果、docetaxel の肝取り込みには主に OATP1B3 が関与していることを明らかにした。さらに、ラット骨髄細胞を用いた毒性試験の結果より、Mrp2 が骨髄細胞において docetaxel の毒性を緩和させる役割を担っていることを明らかにした。

続いて docetaxel の投与によって引き起こされる重篤な好中球減少の発症リスクが OATP1B3, MRP2 のわずかな機能変動によって臨床で報告された好中球減少症の発症リスクの上昇を十分説明しうることを *in silico* での数理モデルを用いた解析の結果からの考察によって明らかとした。

OATP1B3 の機能をヒト *in vivo* で推定するためのプローブ基質として、選択的基質である telmisartan を用いた臨床試験の結果、以前の docetaxel の臨床研究において発見された OATP1B3 の遺伝子多型において、OATP1B3 の機能低下が示唆される結果を得た。またさらに、臨床研究より新たに明らかとなった UGT1A1*28 変異によるクリアランスの上昇メカニズムについても *in vitro* 実験による検討を行い、telmisartan のグルクロン酸抱合代謝に主に関与することが推測される UGT1A3 の発現上昇がその一因となっている可能性を示唆した。

本研究では OATP1B3, MRP2 の遺伝子多型により変動する輸送機能を臨床において定量的に考察することを念頭に置いて研究を進めてきた。一方、これら非翻訳領域に存在した tag SNP が直接あるいは間接的であるかを含め、OATP1B3, MRP2 の機能・発現を変動させるメカニズムについては全く明らかとなっておらず、現在このメカニズムに関しては、共同研究を行っている理化学研究所の中村祐輔先生、薙田泰誠先生、清谷和馬先生らが中心となって解析を進めており、今後の検討課題である。