

氏名	後藤真樹
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	薬博第549号
学位授与の日付	平成16年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科医療薬科学専攻
学位論文題目	MDR1遺伝子解析に基づく臓器移植後の免疫抑制療法個別化に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 乾 賢一 教授 高倉喜信 教授 橋田 充

### 論文内容の要旨

タクロリムスやシクロスポリンなどのカルシニューリン阻害剤を中心とした免疫抑制療法の進展によって、臓器移植医療は末期臓器不全患者に対する一治療として広がりつつある。一方、これらの薬物は有効性の反面、有効血中濃度域が狭く体内動態に個体差が大きいことから、拒絶反応を抑制し腎障害や感染などの副作用を回避するための投与量設定が困難である。タクロリムスは、主に肝チトクロムP450 (CYP) 3Aを介した代謝によって消失する。小腸上皮細胞に発現する薬物輸送体P-糖蛋白質 (Pgp, MDR1) は、CYP3A4を協動的にタクロリムスの吸収障壁として機能することが見出されてきた。Pgpは末梢血白血球にも発現するが、タクロリムスの免疫抑制効果との関係については不明である。そこで著者は、臓器移植患者における免疫抑制療法の個別化を目的とし、小腸並びに肝臓におけるPgp及び代謝酵素の遺伝子情報集積を行い、その臨床的有用性を評価した。また、小腸MDR1発現変動の分子機構について、培養細胞を用いて解析した。さらに末梢血を用いた遺伝子解析による拒絶反応関連因子の探索を行い、以下の知見を得た。

#### I. 小腸移植症例における吸収障壁発現変動と免疫抑制剤の動態制御

小腸MDR1の発現量に基づくタクロリムス投与経路選択の臨床的有用性について小腸移植患者2例で検討を行った。何れの症例においても、小腸MDR1は手術後2～3週目または拒絶反応とステロイドパルス療法後に小腸組織の回復に伴って一過性に発現が亢進した。この高発現時にはタクロリムスは静脈内投与を、以後MDR1発現量の低下を確認後、経口投与に変更することによって血中濃度を目標域 (15～25ng/ml) に維持することができた。また、病理学的に重度の拒絶反応は認められなかった。従って、小腸MDR1発現量に基づくタクロリムスの投与経路選択は、血中濃度維持だけでなく免疫抑制効果の面からも有用であることが示された。

#### II. Caco-2細胞の増殖・分化とMDR1発現変動の比較

小腸MDR1は、拒絶反応や虚血再灌流傷害からの回復に伴い、一過性に発現が亢進することが小腸移植症例において示された。そこで、腸由来上皮細胞Caco-2を用い、MDR1の発現・機能変動、発現調節機序について細胞増殖に着目して詳細な検討を行った。Caco-2細胞においてMDR1発現量はmRNA、蛋白レベル共に細胞の増殖活性に対応して増大し、この発現変動は薬物輸送活性にも反映されていた。Pgpは、増殖期の細胞においては細胞膜上だけでなく細胞質内にも認められたが、細胞の分化に伴って頂側膜上に局在化した。さらに、細胞増殖期のMDR1発現上昇には転写亢進よりもむしろmRNA安定化が寄与していた。これらの結果から、小腸上皮細胞のMDR1は、細胞の増殖・分化に拘らず異物の解毒機構として機能することが示唆された。

#### III. 生体肝移植患者における個別化免疫抑制療法：免疫抑制剤の体内動態制御因子に関する検討

生体肝移植術において、移植される肝臓は部分肝であり術後再生する。肝臓はタクロリムスの主要消失部位であるが、移植肝そのものの状態が変化するため、タクロリムスの体内動態は個体間のみならず個体内の変動も示す。そこで、タクロリムスの体内動態制御因子として小腸MDR1、肝CYP3Aに着目して解析を行った。タクロリムス血中濃度/投与量 (C/D)

比は、術後1週間において、小腸MDR1 mRNA発現量と負に相関した。しかし、移植2週目以降、タクロリムスのC/D比は小腸MDR1よりむしろ肝CYP3A酵素量をCYP3A4 mRNA発現量と移植肝レシピエント体重比(GRWR)の積として近似した値に対応して低下することが明らかになった。次に、遺伝子多型の影響を調べたところ、MDR1遺伝子多型はmRNA発現量、タクロリムスC/D比に影響を及ぼさなかった。一方、肝CYP3A4の多型は認められなかった。また、CYP3A5蛋白が発現するCYP3A5\*1アレルを有する患者群は、蛋白発現が認められCYP3A5\*3/\*3遺伝子型を持つ群と比較して低いC/D比を示した。従って、生体肝移植患者において、タクロリムス血中濃度推移は術後1週間は小腸MDR1の発現量、以降はGRWR及び肝臓CYP3A4とCYP3A5の総和として表される総代謝酵素量に支配されることが示唆された。

#### IV. 生体肝移植患者における個別化免疫抑制療法：拒絶反応予測因子の探索

タクロリムスは末梢血リンパ球におけるIL-2産生阻害を介して免疫抑制作用を発揮する。タクロリムスの免疫抑制効果に対する末梢血Pgpの影響を、発現量と拒絶反応発症との関係で評価した。その結果、MDR1高発現群においては血中濃度が高く維持されているにも拘らず、拒絶反応を発症する場合は認められた。次に、DNAマイクロアレイを用いて拒絶反応に関わる因子を探索したところ、タクロリムスの作用機序と無関係な複数の遺伝子が拒絶反応発症直前に亢進することが示された。従って、末梢血を用いた遺伝子解析の結果、末梢血MDR1発現量は拒絶反応発症の危険因子となることが示唆されるとともに、拒絶反応早期マーカーとなり得る候補遺伝子群を複数抽出することができた。

以上著者は、臓器移植患者の免疫抑制剤治療に対する小腸MDR1並びに肝CYP3A遺伝子情報の臨床的有用性について明らかにした。また、小腸におけるMDR1発現制御機構について新知見を得た。さらに、末梢血を用いた遺伝子解析によってタクロリムス免疫抑制療法に対する危険因子候補の同定を行った。本研究成果は、臓器移植患者における個別化免疫抑制療法確立のための有用な基礎的情報であると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

臓器移植は、末期臓器不全患者に対する根治的治療として定着しつつあり、タクロリムスやシクロスポリンなどのカルシニューリン阻害薬が、術後管理上必須の免疫抑制剤として用いられている。一方、これらの薬剤は有効性の反面、有効治療域が狭いことや体内動態に大きな個体間・個体内変動が存在するため、治療効果を発揮しつつ感染や拒絶反応などの有害作用を回避するための投与量設定が困難である。申請者は、小腸や肝臓及び免疫抑制剤の薬効発現部位である末梢血白血球に発現する薬物トランスポータMDR1や肝薬物代謝酵素CYP3Aサブファミリーについて、これらの遺伝子発現情報や多型情報が免疫抑制療法の個別化に寄与する可能性に着目し、遺伝子情報と臨床情報の集積・解析を行い、以下の新知見を得た。

2例の小腸移植患者を対象に、移植片生検を用いたMDR1発現レベルの数値定量化とそれに基づくタクロリムスの投与設計を行った結果、何れの症例においても良好なタクロリムスの血中濃度が得られ、重度の拒絶反応も回避することができた。さらに、移植小腸における術直後の虚血再灌流傷害からの回復過程において、小腸MDR1発現レベルが一過性に上昇することを見出した。これらの結果から、小腸移植直後からの小腸生検組織を用いたMDR1発現量を参考にしたタクロリムス投与経路の選択が有効であることを明確にした。

臨床で認められた小腸粘膜の再生過程におけるMDR1発現亢進について詳細に解析するために、ヒト腸由来上皮細胞Caco-2を用いたin vitro実験を行った。Caco-2細胞においてMDR1の発現レベルは、細胞の増殖活性と良好に対応すること、分化に伴い低下することを実証した。さらに、細胞の増殖に伴うMDR1発現亢進は、mRNAの安定化に起因することを明らかにした。

次に、生体肝移植患者を対象にタクロリムス体内動態に及ぼす小腸及び肝臓のMDR1並びにCYP3A4サブファミリーの遺伝子の情報の有用性について精査した。181例を対象に解析を行ったところ、生体肝移植直後のタクロリムス血中濃度推移は、移植肝/体重比(GRWR)及び小腸MDR1発現レベルによって強く影響を受けること、これらの情報はタクロリムスの初期投与量設定に応用可能であることが明らかになった。次に、術後経過日数に伴うタクロリムスの全身クリアランス増大について、移植肝薬動態制御因子群の遺伝子情報に着目して解析を行った。その結果、術時の肝生検を用いて得られるCYP3A4発現レベルとCYP3A5遺伝子多型が強く影響すること、CYP3A4発現量が高く且つCYP3A5遺伝子型が野生型の肝臓を移植された患者では、頻回のタクロリムス投与量の漸増を要することが強く示唆された。

さらに、タクロリムスの白血球中への移行調節因子としてのMDR1の重要性について評価したところ、末梢血白血球のMDR1発現量が高い群では、タクロリムスの血中濃度が十分に高く維持されているにも拘わらず約30%に拒絶反応を認めた。一方、末梢血白血球MDR1レベルの低い群では、拒絶反応が認められなかった。従って、末梢血MDR1発現量の数値化は、個別化有効治療域の設定に有用であることが示唆された。

以上の研究は、小腸、肝臓及び末梢血白血球におけるMDR1並びに肝CYP3Aサブファミリーの遺伝子情報が、臓器移植患者における免疫抑制剤の体内動態、薬物治療効果あるいは副作用発現と良好に相関すること、すなわち、これらの遺伝子解析が適切な薬物投与設計を可能にすることを初めて明らかにしたものであり、今後のテーラーメイド免疫抑制療法の実現に貢献するところ大であり、医療薬剤学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成16年2月24日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。