

(論文内容の要旨)

生体部分肝移植は末期肝不全に対する根治的な治療として定着しつつある。この背景にはタクロリムスなどの免疫抑制剤の開発に基づく、著明な移植片生着と生存率の向上によると考えられる。しかしながら、タクロリムスの有効治療域は狭く、体内動態に大きな個体間・個体内変動がみられることから、拒絶や感染または腎障害などの副作用を回避しながら最適な効果を発揮するための投与設計が困難とされている。著者の所属する研究室では、薬物代謝酵素であるチトクロム P450 (CYP) 3A サブファミリーや、*MDR1* 遺伝子にコードされる薬物トランスポータ P-糖蛋白質 (Pgp) の遺伝子多型や発現量が、タクロリムス体内動態に関与することを明らかにしてきた。一方、生体肝移植治療が小児症例を対象に開始された経緯から、成人症例に対するタクロリムス適正使用のための十分な経験と情報に乏しく、当該症例の増加に伴って予期せぬ薬物相互作用や、抗拒絶反応としての高用量ステロイド療法 (ステロイドパルス) が及ぼすタクロリムス体内動態の変動が指摘されるようになったが、分子機構の詳細は不明であった。

そこで著者は、タクロリムスと CYP3A サブファミリーの基質となる併用薬との相互作用、小腸ならびに移植肝の *MDR1* ハプロタイプが及ぼすタクロリムス体内動態への影響、さらにステロイドパルス療法が及ぼすタクロリムス体内動態の変動について成人生体肝移植症例を対象に系統的な解析を行い、以下の新知見を得た。

I. 生体肝移植患者におけるタクロリムス代謝に及ぼす薬物代謝酵素の遺伝子型とプロトンポンプ阻害剤併用の影響

生体肝移植術後のストレス性の潰瘍予防を目的に投与されるプロトンポンプ阻害薬 (PPI) の併用により、タクロリムスの血中濃度が上昇するという報告が腎臓移植患者で散見される。その機序は PPI の代謝を媒介する CYP2C19 の機能欠損により CYP3A を介した相互作用に基づくと考えられているが、肝移植患者では報告例が殆どない。そこで、本院において生体肝移植治療を施行され書面による同意が得られた患者を対象に、末梢血より抽出したゲノム DNA を用いて CYP2C19 ならびに CYP3A5 遺伝子型を PCR-RFLP 法にて判定し、これら遺伝子多型による薬物相互作用について後ろ向きに検討した。ランソプラゾール併用によりタクロリムス血中濃度が高値を認めた症例では、ドナー (移植肝) および患者 (小腸) とともに CYP2C19 遺伝子ならびに CYP3A5 遺伝子が機能欠損型であった。しかし、この相互作用は CYP2C19 遺伝子型よりも CYP3A5 遺伝子型の影響が大きいことが、54 名を対象にした解析により明らかになった。一方、オメプラゾール服用患者においては、CYP3A5 遺伝子型よりも CYP2C19 遺伝子型の影響が大きいこと、移植肝または患者小腸の CYP2C19 機能が保持されていれば、PPI 併用による相互作用発現が回避されることが示唆された。さらに、CYP3A5 を介した PPI によるタクロリムス代謝の阻害が、CYP3A5 発現ミクロソームを用いた *in vitro* 実験においてもはじめて明らかに

なり、CYP3A5 遺伝子多型の重要性を明確にすることができた。

II. 小腸ならびに移植肝の MDR1 ハプロタイプの影響

これまで同定されている MDR1 遺伝子の一塩基多型 (SNP) のうち、G2677T/A と C3435T が最も広く検討されているが、Pgp ならびに CYP3A4 の mRNA 発現量、タクロリムス体内動態に対する影響について一致した見解が得られていない。そこで、生体肝移植患者 63 例ならびにドナー 63 例について、胆管空腸吻合時に切除される空腸組織片および移植肝を用いてリアルタイム PCR 法により、MDR1 ならびに CYP3A4 の mRNA 発現量を定量し、MDR1 ハプロタイプ (G2677T/A-C3435T) との関連を検討した。その結果、MDR1 ハプロタイプは女性患者では TT-TT を有する群が GG-CC、GT-CT を有する群に比し小腸 CYP3A4 の高い発現量と対応を示したが、男性では関連が認められなかった。一方、MDR1 mRNA 発現量やタクロリムス血中濃度/投与量比と、MDR1 ハプロタイプとの関連は男性、女性ともに認められなかった。以上の検討により、女性では、MDR1 ハプロタイプは小腸 CYP3A4 発現量を上昇させるマーカーとなり得るが、タクロリムスの体内動態には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

III. ステロイドパルス療法による移植肝 CYP3A5 の機能誘導

我々はこれまでに生体小腸移植患者において、ステロイドパルス療法によって小腸 CYP3A4 の mRNA 発現量が亢進することを見出したが、機能面に及ぼす影響については不明であった。そこで、生体肝移植患者 18 名を対象に、術後早期における全血中タクロリムス未変化体、並びにその一次代謝物 M-I (13-O 脱メチル体)、M-II (31-O 脱メチル体) 及び M-III (15-O 脱メチル体) を LC/MS/MS 法により定量した。また、移植肝 CYP3A5 遺伝子型について機能タンパク質の発現群と欠損群に層別して代謝物/タクロリムス濃度比を評価した。その結果、代謝物/タクロリムス比は、CYP3A5 発現群では、M-I、M-II、M-III すべてにおいて、ステロイドパルス療法により有意な増加が認められ、主要代謝物と考えられてきた M-I に比して稀少代謝物である M-II、M-III の生成が顕著であった。一方、CYP3A5 欠損群ではステロイドパルス療法による代謝物生成亢進は認められなかった。これらの結果から、CYP3A5 発現肝を移植された患者において、ステロイドパルス療法によるタクロリムスの代謝物、特に稀少とされてきた M-II 及び M-III の生成速度が亢進すること、すなわち CYP3A5 機能誘導をヒト *in vivo* において初めて明らかにすることができた。

以上、著者は薬理ゲノミクスに基づいた生体肝移植後の免疫抑制療法に関する検討を行い、PPI 併用によるタクロリムス体内動態の変動は移植肝に加えて患者小腸の CYP2C19 遺伝子型が支配因子となること、MDR1 ハプロタイプと小腸 CYP3A4 発現量の関連は女性において顕著であること、さらにステロイドパルス療法は以降のタクロリムス代謝能に強く影響を及ぼすことを明らかにした。本研究成果は、成人生体肝移植患者における個別化免疫抑制療法の確立に向けて有用な情報になると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

生体部分肝移植後に免疫抑制剤として用いられるタクロリムスの有効治療域は狭く、体内動態に大きな個体間・個体内変動がみられ、その適正使用法の確立が待たれている。これまで、薬物代謝酵素であるチトクロム P450 (CYP) 3A サブファミリーや、*MDR1* 遺伝子にコードされる薬物トランスポータ P-糖蛋白質 (Pgp) の遺伝子多型や発現量が、タクロリムス体内動態に関与することが指摘されている。一方、生体肝移植治療が小児症例を対象に開始された経緯から、成人症例に対するタクロリムス適正使用のための体内動態変動に関わる分子機構の詳細については不明であった。申請者は、タクロリムスと CYP3A サブファミリーの基質薬物との相互作用、小腸ならびに移植肝の *MDR1* ハプロタイプが及ぼすタクロリムス体内動態への影響、さらに高用量ステロイド静脈内投与 (ステロイドパルス) 療法が及ぼすタクロリムス体内動態の変動について成人生体肝移植症例を対象に系統的な解析を行い、以下の新知見を得た。

生体肝移植術後のストレス性の潰瘍予防を目的に投与されるプロトンポンプ阻害薬 (PPI) 併用が及ぼすタクロリムス血中濃度推移について調べた結果、ランソプラゾール併用によりタクロリムス血中濃度が高値を認めた症例では、ドナー (移植肝) および患者 (小腸) とともに *CYP2C19* 遺伝子ならびに *CYP3A5* 遺伝子が機能欠損型であった。しかし、この相互作用は *CYP2C19* 遺伝子型よりも *CYP3A5* 遺伝子型の影響が大きいことが、54 名を対象にした解析により明らかになった。一方、オメプラゾール服用患者においては、*CYP3A5* 遺伝子型よりも *CYP2C19* 遺伝子型の影響が大きいこと、移植肝または患者小腸の *CYP2C19* 機能が保持されていれば、PPI 併用による相互作用発現が回避されることが明らかとなった。

63 例を対象とした *MDR1* 遺伝子多型 (G2677T/A-C3435T) のハプロタイプ解析の結果、女性患者においてのみ TT-TT を有する群が GG-CC、GT-CT を有する群に比し小腸 CYP3A4 の高い発現量と対応を示し、小腸 CYP3A4 発現の個体差を説明するためのオマーカーとしての本意電子情報の有用性が強く示唆された。

高用量のステロイド薬は様々な薬物代謝酵素の発現変動に影響を及ぼす。生体肝移植患者における急性拒絶反応克服のための治療としてステロイドパルス療法が施行されるが、本治療後のタクロリムス動態特性の変動を説明しうる分子情報については未解明であった。そこで、生体肝移植患者 18 名を対象に、術後早期における全血中タクロリムス未変化体、並びにその一次代謝物 M-I (13-O 脱メチル体)、M-II (31-O 脱メチル体) 及び M-III (15-O 脱メチル体) を LC/MS/MS 法により定量した。また、移植肝 CYP3A5 遺伝子型について機能タンパク質の発現群と欠損群に層別して代謝物／タクロリムス濃度比を評価した。その結果、代謝物／タクロリムス比は、CYP3A5 発現群では、M-I、M-II、M-III すべてにおいて、ステロイドパルス療法により有意な増加が認められ、主要代謝物と考えられてきた M-I に比して稀少代謝物である M-II、M-III の生成が顕著であった。一方、CYP3A5 欠損群ではステロイドパルス療法による代謝物生成亢進は認められなかった。これらの結果から、CYP3A5 発現肝を移植された患者において、ステロイドパルス療法によるタクロリムスの代謝物、特に稀少とされてきた M-II 及び M-III の生成速度が亢進すること、すなわち CYP3A5 機能誘導をヒト *in vivo* において初めて明らかにすることができた。

以上の研究は、PPI 併用によるタクロリムス体内動態の変動は移植肝に加えて患者小腸の CYP2C19 遺伝子型が支配因子となること、MDR1 ハプロタイプと小腸 CYP3A4 発現量の関連は女性に特異的であること、さらにステロイドパルス療法のタクロリムス代謝能に及ぼす影響には CYP3A5 遺伝子多型が深く関わることを明らかにした。本研究成果は、成人生体肝移植患者における薬理ゲノミクスに基づく個別化免疫抑制療法の確立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 21 年 2 月 27 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。