

慢性腎臓病患者の CYP3A 活性に尿毒症物質が与える影響に関する研究

Effect of Uremic Toxin on Cytochrome P450 3A Activity in Patients with Chronic Kidney Disease

令和 5 年度 論文博士申請者 小田 絢子 (Oda, Ayako)

慢性腎臓病 (CKD) 患者への薬物投与において、腎排泄型薬物は腎機能に応じて薬物投与量が調節されるが、肝代謝型薬物の調節は行われぬ。しかし、CKD 患者において、肝代謝型薬物投与時の副作用の発現率の上昇が報告されているため、肝代謝型薬物においても、CKD 患者への投与量調節が必要な可能性がある。

シトクロム P450 (CYP) 3A サブファミリーは、臨床現場で使用される薬物の約 30%~40%の代謝に関与する重要な酵素群である。CYP3A 活性を反映する内在性物質として、 4β -hydroxycholesterol (OHC) が注目されており、 4β -OHC を指標とした CYP3A 活性の評価において、従来、血漿中 4β -OHC 濃度及び 4β -OHC/総コレステロール (TC) 比が使用されている。しかし、 4β -OHC は、コレステロールから CYP3A4 及び CYP3A5 による水酸化だけでなく、非酵素的な酸化、すなわち自動酸化によっても生成されるため、CYP3A 活性を過大評価する可能性がある。

CYP3A 活性の変動要因として、CYP3A5 の遺伝子多型である *CYP3A5*3* アレルのホモ接合体、CKD 時に蓄積する尿毒症物質であるインドキシル硫酸及び副甲状腺ホルモン (PTH) が報告されて

いる。しかし、CYP3A5 の遺伝子多型の影響を考慮した場合、腎機能及び尿毒症物質が CYP3A 活性に与える影響は明らかでない。

そこで、本研究では、CYP3A 活性の評価における適切な内在性指標を検討し、CKD 患者を対象として、腎機能及び尿毒症物質による CYP3A 活性への影響の程度が CYP3A5 の遺伝子多型によって異なるかを検討した。

第一章 CYP3A 活性の評価における適切な内在性指標の検討¹⁾

4 β -OHC の立体異性体である 4 α -OHC は、コレステロールの自動酸化により生成され、CYP3A では生成されない。血漿中 4 β -OHC 濃度の新たな補正方法である 4 β -OHC-4 α -OHC は、コレステロールの自動酸化による血漿中 4 β -OHC 濃度の上昇を補正する可能性があるが、この有用性は明らかでない。また、既報の血漿中 4 β -OHC 及び 4 α -OHC 濃度の同時定量法における定量下限は、それぞれ 0.5 ng/mL 及び 2 ng/mL であり、特に血漿中 4 α -OHC 濃度の感度が不十分な可能性があった。そこで、第一節では、より高感度な血漿中 4 β -OHC 及び 4 α -OHC 濃度の同時定量法を確立することを目的とした。第二節では、一般成人及び CKD 患者を対象として、CYP3A 活性の評価指標としての 4 β -OHC-4 α -OHC の有用性を明らかにすることを目的とした。

第一節 超高速液体クロマトグラフータンデム型質量分析法を用いた血漿中 4 β -OHC 及び 4 α -OHC 濃度の同時定量法の確立

血漿試料の前処理として液液抽出法を採用し、ピコリン酸を使用した誘導体化を行った。前処理後の試料は、C₁₈ カラムを使用して、超高速液体クロマトグラフータンデム型質量分析 (UHPLC-

MS/MS) 法で測定した。移動相の水相には 0.1%ギ酸、有機相には 0.1%ギ酸含有アセトニトリルを使用し、グラジエント溶離を行った。試料のモニタリングには、エレクトロスプレーイオン化法のポジティブイオンモードを採用した。米国食品医薬品局 (FDA) のガイダンスに従い、フルバリデーションを実施し、本定量法の妥当性を評価した。さらに、CKD 患者の血漿中 4β -OHC 及び 4α -OHC 濃度を測定し、臨床適応性を評価した。

バリデーションの結果は、全ての項目について、FDA ガイダンスの基準を満たしていた。短期安定性は、ロックチューブ内、 4°C 及び室温の保存条件下で、 4β -OHC は 30 日間、 4α -OHC は 14 日間の安定性が確認された。CKD 患者の血漿中 4β -OHC 及び 4α -OHC 濃度は、全て検量線の範囲内であった。

以上より、既報と比較して最も高感度な血漿中 4β -OHC 及び 4α -OHC 濃度の同時定量法を確立した。

第二節 CYP3A 活性の評価に対する血漿中 4α -OHC 濃度で補正した血漿中 4β -OHC 濃度の有用性の評価

全国多施設共同コホート研究に参加した 416 名の一般成人及び大分大学医学部附属病院腎臓外科・泌尿器科に通院する 26 名の CKD 患者を対象とした。CKD 患者において、CYP3A5 の遺伝子多型が CYP3A 活性に与える影響を除外するために、野生型である *CYP3A5*1* アレルを保有する患者のみを対象とした。一般成人は、*CYP3A5*1* 保有群 (n=191) 及び非保有群 (n=225) に分類した。CKD 患者は、糸球体濾過量 (GFR) 区分 G3a・G3b 群 (n=14) 及び G4・G5 群 (n=12) に分類した。一般成人では、*CYP3A5*1* アレルの有無の予測、CKD 患者では、GFR 区分 G3a・G3b 又は G4・G5

の予測に関して、3つの CYP3A 活性の指標の受信者動作特性 (ROC) 曲線を作成し、曲線下面積 (AUC) を比較した。

その結果、一般成人

及び CKD 患者において、 4β -OHC- 4α -OHC の AUC と血漿中 4β -OHC 濃度の AUC との間に有意差は認められなかった ($p=0.63$ 及び $p=0.33$ 、図 1)。一般成人において、 4β -OHC- 4α -OHC の AUC は、 4β -OHC/TC 比の AUC と比較して有意に小さかったが ($p=0.025$ 、図 1)、CKD 患者では 2つの指標の間に有意差が認められなかった ($p=0.96$ 、図 1)。

以上より、CYP3A 活性の評価における 4β -OHC- 4α -OHC の有用性は、血漿中 4β -OHC 濃度及び 4β -OHC/TC 比と変わらず、血漿中 4β -OHC 濃度を血漿中 4α -OHC 濃度で補正する必要性は低いことが初めて明らかとなった。

第二章 慢性腎臓病患者を対象とした腎機能及び尿毒症物質が CYP3A 活性に与える影響の評価²⁾

本章では、CKD 患者を対象として、CYP3A5 の遺伝子多型が CYP3A 活性に与える影響を考慮して、腎機能、血漿中インドキシル硫酸及び PTH 濃度が CYP3A 活性に与える影響を明らかにすることを目的とした。大分大学医学部附属病院腎臓外科・泌尿器科に通院する 63 名の CKD 患者を CYP3A5*1 保有群 (n=26) 及び非保

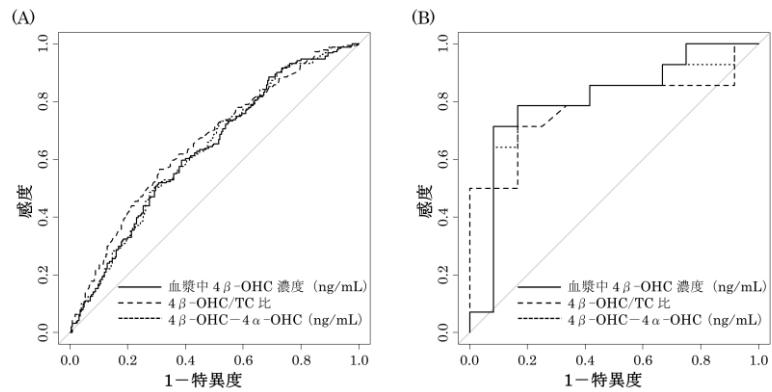


図 1 一般成人における CYP3A5*1 アレルの有無(A)、CKD 患者における GFR 区分 G3a・G3b 又は G4・G5(B)を予測するための各 CYP3A 活性の指標の ROC 曲線

有群 (n = 37) に分類した。CYP3A 活性の指標として、血漿中 4β-OHC 濃度及び 4β-OHC/TC 比の 2 つを使用した。血漿中インドキシル硫酸濃度は UHPLC-MS/MS 法、血漿中 intact-PTH 濃度は電気化学発光免疫測定法を用いて測定した。3) 相関分析及び回帰分析を実施し、各 CYP3A 活性の指標に関連する因子を評価した。

その結果、*CYP3A5*1* 保有群において、2 つの CYP3A 活性の指標と推算 GFR (eGFR) との間に有意な正の相関が認められた (血漿中 4β-OHC 濃度 : $r = 0.57$ 、 $p = 0.0043$ 、4β-OHC/TC 比 : $r = 0.63$ 、 $p = 0.0013$ 、図 2)。一方、非保有群では、2 つの CYP3A 活性の指標と eGFR との間に有意な相関は認められなかった (図 3)。血漿中インドキシル硫酸濃度は、血漿中 4β-OHC 濃度との間に有意な負の相関が認められた (*CYP3A5*1* 保有群 : $r = -0.42$ 、 $p = 0.034$ 、非保有群 : $r = -0.45$ 、 $p = 0.0054$)。一方、重回帰分析では、血漿中

インドキシル硫酸濃度は、2 つの CYP3A 活性の指標に有意に関連する独立因子として特定されなかった。血漿中 intact-

PTH 濃度は、2 つの CYP3A 活性の指標との間に有意な相関は認められなかった。

以上より、

*CYP3A5*1* 保有群に

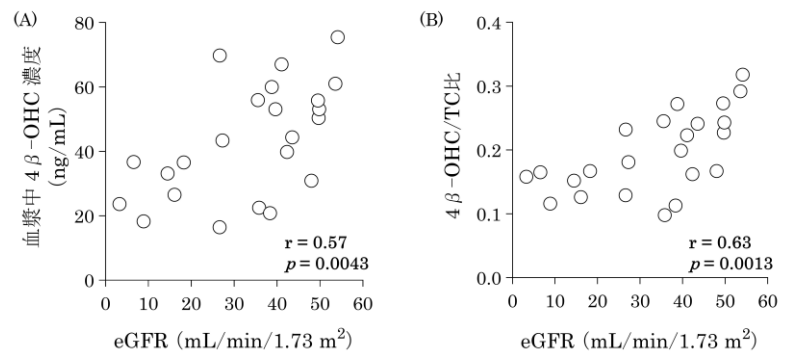


図 2 *CYP3A5*1* 保有群における eGFR と血漿中 4β-OHC 濃度 (A) 及び 4β-OHC/TC 比 (B) との相関

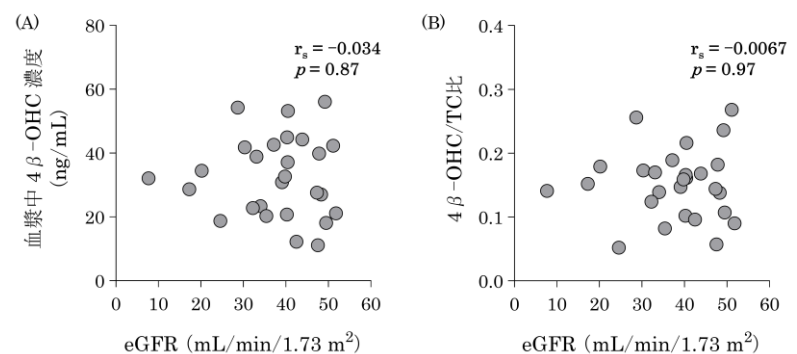


図 3 非保有群における eGFR と血漿中 4β-OHC 濃度 (A) 及び 4β-OHC/TC 比 (B) との相関

において、腎機能の低下に伴い CYP3A 活性が低下したが、非保有群では、腎機能と CYP3A 活性との間に有意な関連性は認められないことが初めて明らかとなった。また、血漿中インドキシル硫酸及び intact-PTH 濃度は、*CYP3A5*1* アレルの有無に関わらず、CKD 患者の CYP3A 活性に臨床的に有意な影響を与えないことが明らかとなった。

総括

本研究では、 4β -OHC を指標とした CYP3A 活性の評価において、血漿中 4β -OHC 濃度を血漿中 4α -OHC 濃度で補正する必要性は低いことを明らかにした。また、*CYP3A5*1* アレルを保有する CKD 患者では、CYP3A により代謝される薬物においても、腎機能に応じた投与量調節が必要である可能性を示唆した。さらに、CKD 患者における血漿中インドキシル硫酸及び intact-PTH 濃度に応じた CYP3A 基質薬物の投与量調節の必要性は低いことを明らかにした。本研究で得られた知見は、臨床での 4β -OHC を指標とした CYP3A 活性の合理的な評価及び CKD 患者における CYP3A 基質薬物の個別化治療に貢献するものである。

《参考文献》

- 1) Suzuki Y., Oda A., Negami J., Toyama D., Tanaka R., Ono H., Ando T., Shin T., Mimata H., Itoh H., Ohno K., *J Lipid Res.*, **63**, 100184 (2022).
- 2) Oda A., Suzuki Y., Yoshijima C., Sato H., Tanaka R., Ono H., Tatsuta R., Ando T., Shin T., Itoh H., Ohno K., *Br J Clin Pharmacol.*, **89**, 3648-3658 (2023).
- 3) Oda A., Suzuki Y., Sato B., Sato H., Tanaka R., Ono H., Ando T., Shin T., Mimata H., Itoh H., Ohno K., *J Sep Sci.*, **45**, 1672-1682 (2022).