



Title	生薬製剤による相互作用評価モデルの構築と応用 : クルクマ属生薬における総括的解析
Author(s)	侯, 晓珑
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47246
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	侯 曉 琰
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 1 0 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学 位 論 文 名	生薬製剤による相互作用評価モデルの構築と応用：クルクマ属生薬における総括的解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 東 純一 (副査) 教 授 宇野 公之 教 授 中川 晋作 教 授 平田 收正

論 文 内 容 の 要 旨

現代医療において、生薬製剤である伝統医薬品が果たす役割は大きい。東西医薬品の併用投与が有効な治療手段となるが、多剤併用療法の適否を判断するエビデンスは乏しい。Herb-drug interaction 予測のための薬物動態学的評価系の確立が、緊急課題である。薬物代謝酵素 Cytochrome P450 (CYP) 3A4 は、主に肝臓、小腸に存在し、多くの薬物代謝に関わっている。特に生薬製剤は経口剤であり、吸収や代謝には小腸が重要な役割を果たしている。経口剤のバイオアベイラビリティを決定するための主要な因子として、CYP3A4 と薬物排出トランスポーターP-glycoprotein (P-gp, MDR1 gene product) の役割が注目されている。

Curcuma (クルクマ) 属生薬は、ショウガ科の *Curcuma* 属植物の地下部を用い、世界各地で生理活性の高い生薬として注目されている。アジアでは、ウコン (*Curcuma longa*)、ハルウコン (*Curcuma aromatica*)、ガジュツ (*Curcuma zedoaria*) が汎用されている。クルクミンはクルクマ属生薬由来の主要成分だが、ガジュツには全く含まれていない。欧米において、クルクミンは、癌化学予防剤としての期待が高まっている。

本研究では、消化管 CYP3A4 を介した薬物間相互作用の評価を目的とし、ヒト結腸癌由来培養細胞 (Caco-2 細胞) を用い、 $1\alpha, 25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ ($1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$) で処置することにより、従来の透過評価系に CYP3A4 代謝能を加えた評価モデルを構築した。次に、クルクミンおよび原材料であるクルクマ属生薬による代替療法の適正使用に対する基盤的研究として、本モデルでの CYP3A4 及び P-gp への影響を総括的に解析した。

これまで、①ヒト組織由来株化細胞では CYP3A4 などの薬物代謝酵素活性が低く、活性評価できない、②ラット由来材料は種差があり、典型的なヒト CYP3A4 誘導剤の rifampicin に反応しない、③酵素反応実験では経口剤でかつ長期間作用を評価できない、などの限界があった。そこで第一に、Caco-2 細胞を用い、CYP3A4 の発現及び活性上昇が報告されていた $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ 処置により、総括的解析モデルを構築した。まず、Caco-2 細胞を transwell に播種し、 $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ 含有培地で 3 週間培養後、CYP3A4 (mRNA、蛋白) 発現維持状況を SYBR GREEN I real time RT-PCR 及び western blot 法で、CYP3A4 活性は基質物質である汎用医薬品 nifedipine (NIF) と内因性物質 testosterone (TST) の代謝物を測定し評価した。 $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ 惹起性 CYP3A4 誘導 Caco-2 細胞は、CYP3A4 を mRNA・蛋白・活性レベルで測定でき、総括的解析が可能であった。これらの反応性は $1\alpha, 25\text{-(OH)}_2\text{-D}_3$ 除去後 96 時間以内も安定しており、RFP 処置による誘導反応も認められ、CYP3A4 は活性、蛋白発現、mRNA 発現の各レ

ベルで再現できた。

第二に、クルクマ属生薬の消化管 CYP3A4 に及ぼす影響について検討した。ウコン、ハルウコン、ガジュツは、遺伝子解析により同定された日本産日本市場品の各根茎から MeOH 抽出エキス調製した。まず、各エキス/クルクミンの Caco-2 細胞への増殖抑制作用を MTS 法で調べた。各エキス、クルクミンの細胞毒性濃度 (CC₅₀) は各 0.14 mg/ml、0.18 mg/ml、0.19 mg/ml、73 μ M であった。そこで毒性の認められない濃度 (エキス 0.1 mg/ml とクルクミン 30 μ M) を用い、CYP3A4 誘導 Caco-2 細胞に 72 時間前処置すると、各エキスは CYP3A4 活性を示す指標である NIF oxidation 及び TST 6 β -hydroxylation を約 80~95%低下させる強い阻害作用を示した。各エキスの NIF に対する活性阻害濃度 (IC₅₀) は、0.019 mg/ml、0.017 mg/ml 及び 0.014 mg/ml であったが、クルクミンの CYP3A4 阻害作用は弱く、IC₅₀ が算出できなかった。クルクマ属生薬は小腸 CYP3A4 活性を阻害する可能性があるが、本活性阻害に対するクルクミンの関与は低いと考えられた。生薬エキスやクルクミンによる CYP3A4 活性阻害作用は、mRNA レベルではなく、蛋白レベルで惹起されていたことも明らかにした。さらに、クルクマ属生薬の CYP3A4 蛋白発現抑制メカニズムについて蛋白合成阻害剤である cycloheximide を用いて検討した。その結果、蛋白発現レベルの低下は、その分解が生薬処置によって亢進したと考えられた。クルクミンは服用後速やかに代謝され、主要還元体代謝物として tetrahydrocurcumin (THC) が報告されている。そこで、THC による CYP3A4 mRNA 誘導作用を HepG2 細胞で、阻害作用をヒト肝 microsome の代謝物活性で評価した。THC には RFP で認められる CYP3A4 mRNA 誘導作用はなく、CYP3A4 代謝活性の IC₅₀ は 21 μ M で、報告されている THC の血中濃度の 2~25 倍と高濃度であった。

小腸には CYP3A4 だけでなく P-gp が発現しており、両者の基質特異性は類似している。また、癌細胞が耐性を獲得するメカニズムに P-gp は関与している。第三に、P-gp 介在性分泌輸送について、rhodamine123 や ³H-digoxin を用い、クルクマ属生薬エキス/クルクミンの影響を検討した。Basal 側に添加した rhodamine123 の apical 側への排出は、P-gp 活性阻害剤 verapamil で 50%阻害され、クルクミンも同程度の強い阻害作用を示した。細胞内 rhodamine123 濃度からも同様の阻害作用が示唆された。これに対し各エキスによる P-gp 介在性分泌輸送は 1.5~1.8 倍と有意に増加し、細胞内残存量は低値であった。また、³H-digoxin を基質とした場合、apical 側または basal 側それぞれの輸送活性から net efflux を算出した。クルクミンは ³H-digoxin の net efflux を約 50%に低下させる強い阻害作用を示し、各エキスは 2.5~4.1 倍に誘導した。すなわち、主要成分のクルクミンは阻害、原材料生薬エキスでは誘導と相反する作用を認めた。これらの誘導/抑制作用は、P-gp mRNA レベルから惹起されていたが、各エキス/クルクミン除去 72 時間後にはコントロールレベルに回復した。

これら知見をまとめた。生薬製剤を適正に使用するためには、現代医学に通じる手法を用いて、有効性や有害性の根拠を明確にする必要がある。1 α , 25-(OH)₂-D₃ 惹起性 CYP3A4 誘導 Caco-2 細胞モデルは、相互作用評価に有用で総括的解析が可能である。クルクマ属生薬エキスは、CYP3A4 蛋白分解を促進することにより、消化管 CYP3A4 活性を抑制する可能性があるが、本阻害作用に対するクルクミンの関与は低いことが示唆された。クルクマ属生薬エキス/クルクミンが異なる作用で、消化管 P-gp 介在分泌輸送を変化させることを明らかにし、併用薬物動態への影響を示唆した。これらの生薬製剤は代替療法に使用されていることから、適正使用のためには原材料生薬と主要成分での作用が異なることへの十分な注意が必要である。しかし、抗癌剤耐性に対する P-gp 抑制は重要で、癌予防や抗癌剤の副作用軽減治療を期待した代替療法におけるクルクミン使用の根拠となる。

CYP3A4 や P-gp の発現や機能に影響を与える要因については、幅広い情報を蓄積することが、治療の最適化を実現するために必要不可欠と考える。今後、生薬製剤併用療法の機会は増加傾向にあることから、有用性や安全性に関わる総括的検討は、適正使用の一助になると信じる。

論文審査の結果の要旨

現代医療において、生薬製剤である伝統医薬品が果たす役割は大きい。東西医薬品の併用投与が有効な治療手段となる場合も少なくないが、多剤併用療法の適否を判断するエビデンスは乏しい。Herb-drug interaction 予測のための薬物動態学的評価系の確立が、緊急課題である。

申請者は、消化管 CYP3A4 を介した薬物間相互作用の評価モデルを構築し、クルクミンおよび原材料であるクルクマ属生薬による代替療法の適正使用に対する基盤的研究として、本モデルでの CYP3A4 及び P-gp への影響を総括的に解析した。1 α , 25-(OH) $_2$ -D $_3$ 惹起性 CYP3A4 誘導 Caco-2 細胞モデルは、相互作用評価に有用で総括的解析が可能である。クルクマ属生薬エキ스는、CYP3A4 蛋白分解を促進することにより、消化管 CYP3A4 活性を抑制する可能性を見出し、更に本阻害作用に対するクルクミンの関与は低いことを明らかにした。また、クルクミン及びクルクマ属生薬エキスの前処置により、P-gp 介在分泌輸送を変化させることを明らかにした。主要成分のクルクミンは酵素活性阻害、原材料生薬エキスでは酵素誘導と相反する作用を見出した。これらの生薬製剤は代替療法に使用されていることから、適正使用のためには原材料生薬と主要成分との作用が異なることへの十分な注意が必要である。しかし、抗癌剤耐性に対する P-gp 抑制は重要で、抗癌剤の副作用軽減治療を期待した代替療法におけるクルクミン使用の根拠となる。

生薬製剤を適正に使用するためには、現代医学に通じる手法を用いて、有効性や有害性の根拠を明確にする必要がある。今後、生薬製剤併用療法の機会は増加傾向にあることから、有用性や安全性に関わる総括的検討は、生薬製剤の臨床使用に貢献するものであり、学位論文として高く評価される。