

体内時計による医薬品体内動態の概日リズム制御

九州大学大学院薬学研究院薬剤学分野
小柳 悟, 松永直哉, 大戸茂弘

1. はじめに

生体機能の概日リズムを制御する体内時計の働きによって、薬の効果や副作用の発現は投薬時刻によって変化する。一般に薬の効果は作用部位における「薬物の濃度」とその部位における「薬物に対する感受性」によって規定されるが、薬物が投与された部位から作用部位に到達するには、いくつもの「関門」があり、投与された薬物の全てが作用部位に移行することはない。表1には、薬物の体内動態に影響を及ぼす生体機能の概日リズムを示すが、これら各過程における生体機能のリズムが成因となって作用部位における薬物の濃度は投与時刻依存的に変化し、薬の効果・副作用の発現に概日性的変動が生じる。本稿では、薬物の体内動態に影響を及ぼす生体機能の概日リズムとその制御メカニズムについて概説する。

2. 体内時計の分子メカニズム

1997年に哺乳類動物における最初の時計遺伝子 *Clock* が発見されて以降、時計遺伝子を中心とした分子レベルでの概日リズム発振機構が明らかになってきた。近年の研究から時計遺伝子の変異や欠損動物では薬物の体内動態制御に関わる分子の発現に変化が生じることが明らかとなり^{1,2)}、体内時計の分子機構の治療学的意義に注目が集まっている。CLOCK, BMAL1, PERIOD (PER), CRYPTOCHROME (CRY)によって形成されるコア・フィードバックループ機構によって、PAR bZip 転写因子の発現に概日性的変動が生じる(図1)。これまでに哺乳類動物では3種類の PAR bZip 転写因子(DBP: albumin D-site binding protein, HLF: hepatic leukemia factor, TEF: thyrotroph embryonic factor)が同定されており、これらは種を超えて高い相同性を有している。PAR bZip 転写因子のノック

アウトマウスでは、肝臓や腎臓における薬物動態関連因子の発現に変化が認められ(表2)、これら転写因子は、体内時計の中心機構と薬物の体内動態とを繋ぐメディエーターとして機能していると考えられる。また、cAMP-response element (CRE) binding protein (CREB)のひとつである activating transcription factor 4 (ATF4)の発現にも小腸、肝臓、腎臓などにおいて概日性リズムが認められ、この転写因子の発現リズムもコア・フィードバックループ機構によって制御されている(図1)。ATF4の欠損細胞ではABCトランスポーターや各種の抱合酵素をコー

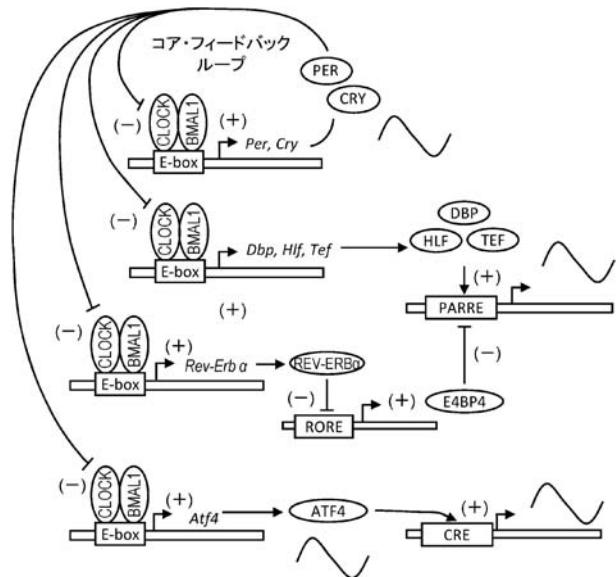


図1 概日時計のコア・フィードバックループ機構による PAR-bZip 転写因子および ATF4 の発現リズム制御メカニズム
CLOCK, BMAL1, PERIOD (PER), CRYPTOCHROME (CRY)によって形成されるコア・フィードバックループによって、PAR-bZip 転写因子(DBP, HLF, TEF)の発現には概日リズムが生じる。また、同様の機構により REV-ERB α , E4BP4 の発現にも概日リズムが生じる。PAR-bZip 転写因子と E4BP4 は、PAR-bZip Response Element (PARRE)に交互に結合し、転写の促進と抑制とを繰り返すことで標的遺伝子の発現リズムを制御する。同様に ATF4 の転写もコア・フィードバックループによって制御され、c-AMP response element (CRE)を介して標的遺伝子の発現に概日リズムを生じさせる。

表1 薬物の吸収、分布、代謝、排泄に影響を及ぼす生体機能の概日リズム

吸収 (主に消化管)	分布	代謝 (主に肝臓)	排泄 (主に腎臓)
<ul style="list-style-type: none"> 消化管血流速度 胃酸分泌 胃内排泄速度 消化酵素分泌 胆汁酸分泌 トランスポーター機能 	<ul style="list-style-type: none"> 血流速度 血球移行性 血中タンパク濃度 (タンパク結合率) 	<ul style="list-style-type: none"> 肝血流速度 代謝酵素活性 血中タンパク濃度 (タンパク結合率) 	<ul style="list-style-type: none"> 腎血流速度 糸球体濾過速度 血中タンパク濃 (タンパク結合率) 尿管分泌 尿の pH

表2 PAR-bZIP 転写因子のノックアウトマウスにおいて発現量が変化する薬物動態関連分子

チトクローム P450	グルタチオン-S-トランスフェラーゼ	トランスポーター
<i>Cyp2b10</i>	<i>Gstt1</i>	<i>AbcbA6</i>
<i>Cyp2c50</i>	<i>Gsta3</i>	<i>AbcA8a</i>
<i>Cyp4a10</i>	UDP-グルクロン酸トランスフェラーゼ	<i>Abcb1b</i>
<i>Cyp4a14</i>	<i>Ugt1a1</i>	<i>AbcC4</i>
アルデヒドデヒドロゲナーゼ	<i>Ugt2b37</i>	<i>AbcG2</i>
<i>Aldh1a1</i>	スルホトランスフェラーゼ	
<i>Aldh1a7</i>	<i>Sult1d1</i>	
<i>Aldh3a2</i>	<i>Sult3a1</i>	

文献2)から一部抜粋.

とする遺伝子の発現に変化が認められることから³⁾, 本転写因子も体内時計の中心機構から出力因子と機能していると考えられる.

3. 吸収過程における概日リズム

一般に, 経口投与された薬物の多くは小腸上部において吸収され, 門脈, 肝臓を経て全身循環へと移行する. 投与された薬物が胃を通過して小腸に到達するまでの速度 (Gastric Emptying Rate: GER) には概日性的の変動が認められており, 薬物の吸収速度に影響を及ぼす⁴⁾.

一方, 小腸上皮細胞からの薬物の吸収には種々のトランスポーターが関与する. ABC トランスポーターのひとつである P 糖タンパク質 (Multidrug Resistance Protein 1: MDR1) は多くの薬物を基質とし, その吸収に対しては抑制的に機能する. P 糖タンパク質の基質のひとつであるジゴキシンの吸収にはヒトおよび実験動物 (マウス, ラット) のいずれにおいても時刻依存的な差異が認められている⁵⁻⁷⁾. 実験動物において, 消化管での P 糖タンパク質 (p-glycoprotein: *abcb1*), BCRP (Breast Cancer Resistance Protein: *abcg2*), MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2: *abcc2*) などの ABC トランスポーターの発現は概日リズムを示し⁷⁻⁹⁾, 基質薬物の消化管からの吸収に時刻の違いによる差異を引き起こす. これら ABC トランスポーターの発現リズムは, PAR bZip 転写因子や ATF4 などを通じて転写・翻訳のフィードバック機構により制御されている (図2). また, 実験動物においてであるが, バラシクロビルなどの消化管吸収に関与するペプチドトランスポーター1 (PEPT1) の発現や機能にも概日リズムが認められ, その転写制御には PAR bZip 転写因子のひとつである DBP が関与していることが明らかになっている¹⁰⁾.

4. 分布過程における概日リズム

分布は薬物が作用部位に到達して効果を発揮するための重要な過程である. また, 作用部位以外に移行した薬物は

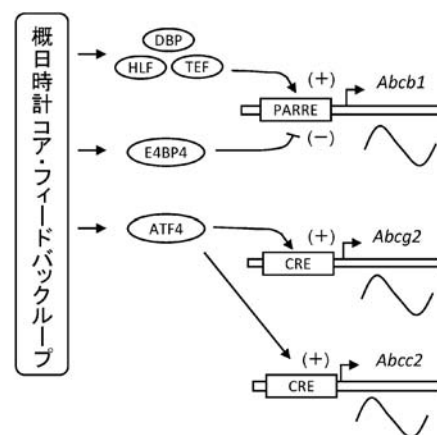


図2 消化管における ABC トランスポーターの発現リズム制御機構の模式図

概日時計のコア・フィードバック機構によって制御される PAR-bZip 転写因子 (DBP, HLF, TEF) および E4BP4 の発現リズムによって, *Abcb1* 遺伝子の発現に概日リズムが生じる. また, ATF4 の発現リズムによって, *Abcg2* および *Abcc2* 遺伝子の発現に概日性的の変動が生じる.

副作用を引き起こすことがあるため, 薬物の体内分布の特性を知ることは安全性の理解においても必要不可欠である. 血中のアルブミンは様々な薬物と結合して組織移行性に影響を及ぼすが, ヒトにおいてその血中濃度には概日リズムが認められている¹¹⁾. 一般に, タンパク結合率の高い薬物は, その結合率のわずかな変動によって組織移行性が影響を受けやすい. そのため, アルブミンへの結合率が高い薬物では血液中のアルブミン濃度が高い場合に比べ, 低い場合において非結合型の薬物濃度が上昇し, 組織への移行性が増大すると考えられる.

また, 薬物の組織または病巣部位への移行性は毛細血管の構造や, 血流速度, トランスポーターの働きなどによっても影響を受けるが, ヒトにおいて薬物の組織移行量の概日リズムについての報告は少ない. 一方で, 担がんモデル動物において抗がん剤の腫瘍細胞内への移行量に時刻依

存的な差異が報告されている。トランスフェリンリポゾームは、薬物を封入できるリポゾームの表面にトランスフェリンを融合させた製剤であり、がん細胞表面に高発現するトランスフェリン受容体を介して、細胞内に抗がん剤を効率的に送達することを指向した DDS (Drug Delivery System) 製剤である¹²⁾。トランスフェリンリポゾームに抗がん剤であるオリサリプラチンを封入して担がんマウスに静脈内投与したところ、腫瘍細胞内へのオリサリプラチンの移行量に投薬時刻依存的な差異が認められている¹³⁾。これは細胞表面でのトランスフェリン受容体の発現が概日性的の変動を示すためであるが、腫瘍細胞においては P 糖タンパク質などの薬剤排泄型トランスポーターの発現にも概日リズムがあることが報告されており⁷⁾、これら輸送担体の機能リズムも相まって、腫瘍細胞内での抗がん剤の蓄積量に投薬時刻の違いによる差異が生じると考えられる。

5. 代謝過程における概日リズム

肝代謝型薬物の体内動態に投薬時刻依存的な差異が認められることから、ヒトにおけるチトクローム P450 (CYPs) の活性に概日性的の変動があることが指摘されている。しかしながら CYPs タンパクはヒトと実験動物(マウス, ラット)で相同性や発現量が大きく異なるため、その発現リズムの制御機構にも種差があると予想される。これまでヒトを対象とした生体リズム研究は、組織からの頻繁な細胞接種が制限されることから分子レベルでの解析が困難であった。一方、細胞を高濃度血清やステロイド剤で刺激することで、概日時計の機能を培養細胞内で再構築できることが知られている¹⁴⁻¹⁶⁾。培養したヒト肝細胞を高濃度血清で処理したところ、*CYP3A4*, *CYP2D6*, *CYP2E1* の発現に概日性リズムが認められている¹⁷⁻¹⁹⁾。

CYP3A4 遺伝子の転写活性調節領域には PAR bZip 転写因子の結合配列が存在し、その転写活性は DBP によって促進される。また、本配列への DBP の結合は、*CYP3A4* の mRNA 量が上昇する際には高値を、減少する際には低値を示すことから、*CYP3A4* 遺伝子の発現リズムも PAR bZip 転写因子を介してコア・フィードバック機構によって制御されていると考えられる(図 3)。 *CYP2D6* の発現リズムは CCAAT enhancer binding protein α (C/EBP α) による転写の促進を differentiated embryo chondrocyte-2 (DEC2) が周期的に抑制することで引き起こされ(図 3)、再構築系の培養細胞内において *CYP2D6* の酵素活性に概日性的の変動が認められている。また、*CYP2E1* の発現リズムは hepatic nuclear factor-1 α (HNF1 α) と時計遺伝子 *CRY1* との相互作用によって生じることが明らかになっている(図 3)。 Well-stirred モデルに従った場合、抽出率が低い薬物では、肝クリアランスが肝固有クリアランスに依存するため、薬物代謝酵素活性の概日リズムによって、薬

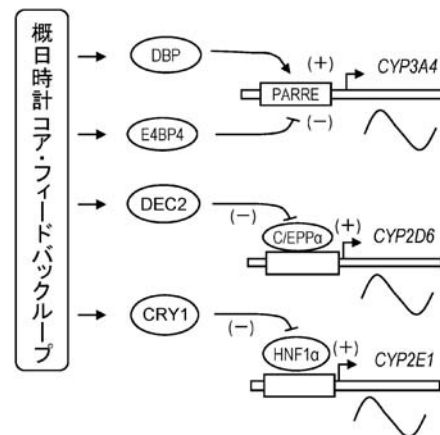


図 3 ヒト CYP 遺伝子の発現リズム制御機構の模式図

概日時計のコア・フィードバック機構によって生じた PAR-bZip 転写因子 (DBP) および E4BP4 によって、*CYP3A4* 遺伝子の発現に概日リズムが生じる。また、同様にコア・フィードバック機構によって発現リズムが制御される DEC2, *CRY1* は、C/EBP α , HNF1 α の転写活性を周期的に抑制し、*CYP2D6* 遺伝子および *CYP2E1* 遺伝子の発現に概日リズムを生じさせる。

物の代謝能は影響を受けやすいと考えられる。一方、抽出率が高い薬物の場合、肝クリアランスは肝血流速度に依存するが、ヒトにおける肝血流速度には概日性的の変動が認められており²⁰⁾。そのため、肝クリアランスが血流律速の薬物では、この影響を受けやすいと考えられる。

6. 排泄過程における概日リズム

これまでにヒトを対象にした研究において、シスプラチン、オキサリプラチン、メトトレキサート、シクロスポリン、バルプロ酸ナトリウムなどの腎クリアランスに投薬時刻の違いによる差異が報告されている²¹⁻²⁵⁾。腎臓からの薬物の排泄には①糸球体濾過、②尿細管分泌、③尿細管再吸収の各過程が関与するが、ヒトにおいてインスリンを用いて測定した糸球体濾過速度 (glomerular filtration rate: GFR) には概日性的の変動があり、昼日と夜間で約 1.5 倍の差異が認められている²⁶⁾。また、近位尿細管における薬物の排泄には種々のトランスポーターが関与している。現在までのところ、ヒトにおける腎のトランスポーターの発現に概日性リズムがあるとの報告はないが、尿細管分泌/再吸収の機能に時刻依存的な差異があることが示唆されている²⁷⁾。また、実験動物においては遠位尿細管での Slc トランスポーターの発現に概日リズムが認められている²⁸⁾、それらリズムが薬物の腎排泄機能にどのような影響を及ぼしているのかは今後の検討課題である。

一方、胆汁排泄が主な排泄経路となっている薬物の多くは肝臓において CYPs などによって代謝された後、抱合化を受け胆汁中に排泄される。分子量が 350~5,000 程度

の薬物は胆汁中に排泄され易いことが知られているが、この過程にも複数のトランスポーターが関与する。これまで、実験動物においては肝臓での胆汁酸の産生系路に概日性の変動があることが明らかにされており²⁹⁾、薬物の胆汁排泄にも時刻依存的な差異があることが示唆されている。

7. おわりに

本稿では薬物の体内動態に影響を及ぼす生体機能の概日リズムについて、吸収、分布、代謝、排泄の各過程に分けて概説した。序論でも述べたが、作用部位における薬物濃度の投薬時刻依存的な差異はこれら各過程のリズムが相互に影響を及ぼし合うことで引き起こされる。また、血中濃度や作用部位での濃度に投薬時刻による差異が認められない薬物においても、作用部位の薬物に対する感受性のリズムによって、その効果に概日性の変動が生じる場合もある。そのため、時間薬物療法の施行に際しては薬物動態のリズムの加え、感受性のリズムの寄与も考慮に入れ、至適投薬タイミングの設定を行うことが重要である。

参考文献

- 1) Miller, B. H., McDearmon, E. L., Panda, S., *et al.*: Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**: 3342–3347 (2007).
- 2) Gachon, F., Olela, F. F., Schaad, O., *et al.*: The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab.*, **4**: 25–36 (2006).
- 3) Koyanagi, S., Hamdan, A. M., Horiguchi, M., *et al.*: cAMP response element-mediated transcription by activating transcription factor-4 (ATF4) is essential for circadian expression of the Period2 gene. *J. Biol. Chem.*, **286**: 32416–32423 (2011).
- 4) Goo, R. H., Moore, J. G., Greenberg, E., *et al.*: Circadian variation in gastric emptying of meals in humans. *Gastroenterology*, **93**: 515–518 (1987).
- 5) Erol, K., Kilic, F. S., Batu, O. S., *et al.*: Morning-evening administration time differences in digoxin kinetics in healthy young subjects. *Chronobiol. Int.*, **18**: 841–849 (2001).
- 6) Hayashi, Y., Ushijima, K., Ando, H., *et al.*: Influence of a time-restricted feeding schedule on the daily rhythm of abcb1a gene expression and its function in rat intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **335**: 418–423 (2010).
- 7) Murakami, Y., Higashi, Y., Matsunaga, N., *et al.*: Circadian clock-controlled intestinal expression of the multidrug-resistance gene mdr1a in mice. *Gastroenterology*, **135**: 1636–1644 (2008).
- 8) Hamdan, A. M., Koyanagi, S., Wada, E., *et al.*: Intestinal expression of mouse Abcg2/Bcrp gene is under the control of circadian clock-activating transcription factor-4 pathway. *J. Biol. Chem.*, **287**: 17224–17231 (2012).
- 9) Okyar, A., Piccolo, E., Ahowesso, C., *et al.*: Strain- and sex-dependent circadian changes in abcc2 transporter expression: implications for irinotecan chronotolerance in mouse ileum. *PLoS One*, **6**: e20393 (2011).
- 10) Saito, H., Terada, T., Shimakura, J., Katsura, T. and Inui, K.: Regulatory mechanism governing the diurnal rhythm of intestinal H⁺/peptide cotransporter 1 (PEPT1). *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, **295**: G395–402 (2008).
- 11) Jubiz, W., Canterbury, J. M., Reiss, E., *et al.*: Circadian rhythm in serum parathyroid hormone concentration in human subjects: correlation with serum calcium, phosphate, albumin, and growth hormone levels. *J. Clin. Invest.*, **51**: 2040–2046 (1972).
- 12) Ishida, O., Maruyama, K., Tanahashi, H., *et al.*: Liposomes bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors in vivo. *Pharm. Res.*, **18**: 1042–1048 (2001).
- 13) Okazaki, F., Matsunaga, N., Okazaki, H., *et al.*: Circadian rhythm of transferrin receptor 1 gene expression controlled by c-Myc in colon cancer-bearing mice. *Cancer Res.*, **70**: 6238–6246 (2010).
- 14) Balsalobre, A., Brown, S. A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., Schütz, G. and Schibler, U.: Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*, **289**: 2344–2347 (2000).
- 15) Balsalobre, A., Damiola, F. and Schibler, U.: A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, **93**: 929–937 (1998).
- 16) Nagoshi, E., Brown, S. A., Dibner, C., *et al.*: Circadian gene expression in cultured cells. *Methods Enzymol.*, **393**: 543–557 (2005).
- 17) Takiguchi, T., Tomita, M., Matsunaga, N., *et al.*: Molecular basis for rhythmic expression of CYP3A4 in serum-shocked HepG2 cells. *Pharmacogenet. Genomics*, **17**: 1047–1056 (2007).
- 18) Matsunaga, N., Inoue, M., Kusunose, N., *et al.*: Time-dependent interaction between differentiated embryo chondrocyte-2 and CCAAT/enhancer-binding protein α underlies the circadian expression of CYP2D6 in serum-shocked HepG2 cells. *Mol. Pharmacol.*, **81**: 739–747 (2012).
- 19) Matsunaga, N., Ikeda, M., Takiguchi, T., *et al.*: The molecular mechanism regulating 24-hr rhythm of CYP2E1 expression in the mouse liver. *Hepatology*, **48**: 240–251 (2008).
- 20) Lemmer, B. and Nold, G.: Circadian changes in estimated hepatic blood flow in healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **32**: 627–629 (1991).
- 21) Hrushesky, W. J., Borch, R. and Levi, F.: Circadian time dependence of cisplatin urinary kinetics. *Clin. Pharmacol.*

- Ther.*, **32**: 330–339 (1982).
- 22) Lévi, F., Metzger, G., Massari, C., *et al.*: Oxaliplatin: pharmacokinetics and chronopharmacological aspects. *Clin. Pharmacokinet.*, **38**: 1–321 (2000).
 - 23) Ferrazzini, G., Sohl, H., Robieux, I., *et al.*: Diurnal variation of methotrexate disposition in children with acute leukaemia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **41**: 425–427 (1991).
 - 24) Choi, J. S. and Park, H. J.: Circadian changes in pharmacokinetics of cyclosporin in healthy volunteers. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **103**: 109–112 (1999).
 - 25) Reith, D. M., Andrews, J., McLaughlin, D., *et al.*: Valproic acid has temporal variability in urinary clearance of metabolites. *Chronobiol. Int.*, **18**: 123–139 (2001).
 - 26) Koopman, M. G., Koomen, G. C., Krediet, R. T., *et al.*: Circadian rhythm of glomerular filtration rate in normal individuals. *Clin. Sci. (Lond)*, **77**: 105–111 (1989).
 - 27) Voogel, A. J., Koopman, M. G., Hart, A. A., *et al.*: Circadian rhythms in systemic hemodynamics and renal function in healthy subjects and patients with nephrotic syndrome. *Kidney Int.*, **59**: 1873–1880 (2001).
 - 28) Zuber, A. M., Centeno, G., Pradervand, S., *et al.*: Molecular clock is involved in predictive circadian adjustment of renal function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**: 16523–16528 (2009).
 - 29) Le Martelot, G., Claudel, T., Gatfield, D., *et al.*: REV-ERB α participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. *PLoS Biol.*, **7**: e1000181 (2009).