

## 時間薬理学における分子基盤

小柳 悟

### 1. はじめに

従来までの薬理学および薬物治療における基本的な考え方は、薬物に対する生体の応答性（薬理反応）は投薬する時刻に関わらず常に一定で変化しない。あるいは、変化があるとしても、それは無視しうるほどに小さいことを前提に成り立っていた。しかし、薬物治療の実際を仔細に検討してみると、こうした考え方では説明できない事象が数多く認められ、生体の薬物に対する応答性は必ずしも一定ではないことが推測できる。身体の個々の細胞には時計遺伝子が発現し、神経の活動性をはじめ、ホルモン分泌や代謝酵素の活性などさまざまな生体機能に約 24 時間周期の概日変動を引き起こしている。

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」によって決定されるが、近年の研究から、時計遺伝子は薬物の体内での挙動や感受性に関わる分子の発現に影響を与え、その薬効に投薬時刻の違いによる差異を引き起こすことが明らかになってきた（時間薬理学）。本稿では、薬物の体内動態や細胞の抗がん剤感受性に影響を及ぼす因子の概日変動のメカニズムを中心に、時間薬理学の分子基盤について概説する。

### 2. 薬効に関与する概日時計因子

薬物が投与された部位から作用部位に移行するにはいくつかの「関門」があり、投与された全量の薬物が作用部位（病巣部位）に到達することはない。生体に投与された薬物は、投与部位から「吸収」され脈管系に入り、その一部が作用部位に到達（「分布」）して薬理効果を発揮する。また、これと同時に一部の薬物は肝臓などに発現する酵素によって「代謝」を受けたり、腎臓から尿中へと「排泄」されたりする。体内および作用部位における薬物の濃度は、

これら吸収、分布、代謝、排泄の各過程が相互に影響し合うことで規定される。また、薬物の標的分子の発現や機能に概日リズムがある場合、それらのリズムによって作用部位の薬物に対する感受性にも時刻依存的な変化が生じる。

生体機能の概日リズムは時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群が約 24 時間周期で発現の増減を繰り返すことで引き起こされる。時計遺伝子は「転写促進因子（CLOCK, BMAL など）」と「転写抑制因子（PER, CRY など）」が互いの発現を調整するコアループを形成し（図 1）、その下流にある出力因子の発現リズムを制御することで、さまざまな生体機能に概日性的変動を引き起こす。

これら出力因子のなかには、DBP (albumin D-site binding protein), HLF (hepatic leukemia factor), TEF (thyrotroph embryonic factor) などの PAR bZip 転写因子や、脂質代謝

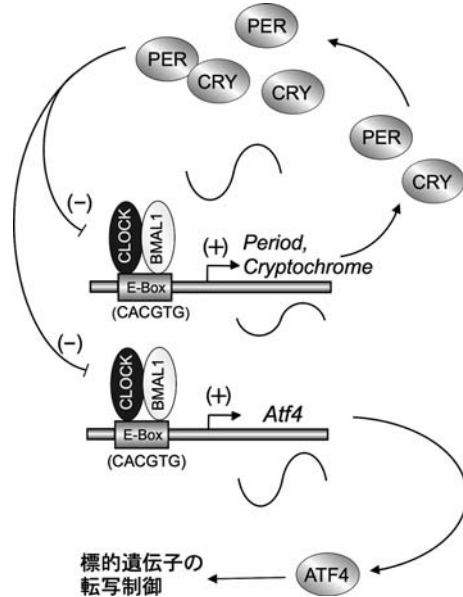


図 1 ATF4 の発現リズム制御機構

Period (Per), Cryptochrome (Cry) の各遺伝子の E-box に CLOCK/BMAL1 のヘテロ二量体が結合して転写を促進する。産生された PER および CRY タンパクは CLOCK/BMAL1 による自らの転写活性を抑制する（コアループ機構）。これら転写の促進と抑制が交互に繰り返される結果、PER, CRY の発現は 24 時間周期で増減を繰り返す。同様に CLOCK/BMAL1 は *Atf4* 遺伝子の転写活性を促進するが、この転写活性も PER, CRY によって周期的に抑制を受けるため、ATF4 の発現に概日リズムが生じる。

九州大学大学院薬学研究院薬剤学分野（〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1）

#### Molecular basis of chronopharmacology

Satoru Koyanagi (Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan)

などに関与する PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferators-activated receptor  $\alpha$ ) などが含まれている<sup>1,2)</sup>. cAMP response element binding (CREB) タンパク質の一つである ATF4 (activating transcription factor 4) は小胞体ストレスなどによって誘導され、アミノ酸代謝や細胞周期の制御などに関わっているが、我々は ATF4 の発現が時計遺伝子によって制御されて概日リズムを示すことを見いだした (図 1)<sup>3)</sup>. これら出力因子は消化管における薬物輸送トランスポーターや、がん細胞の抗がん剤に対する感受性に概日変動を引き起こし、薬物の体内挙動や効果に投薬時刻の違いによる差異を生じさせる。

### 3. 薬物輸送トランスポーターの概日リズム

生体膜上に発現するトランスポーターは、薬物の消化管からの吸収や、肝臓内への取り込み、胆汁中への排泄、脳への移行、腎臓からの排泄などさまざまな働きを持つ。たとえば、*ABC1* 遺伝子によってコードされる P 糖タンパク質 (multidrug resistance protein 1: MDR1) は、狭心症治療薬のジゴキシンなど多くの薬物を基質とし、細胞内へ取り込まれた薬物を細胞外へと汲み出す排泄型トランスポーターとして機能している。消化管において P 糖タンパク質は、小腸上皮細胞内に取り込まれた薬物を消化管腔側へ汲み出す排泄型トランスポーターとして機能しており、経口投与された薬物の吸収に対しては抑制的に作用する。ヒトにおいて、ジゴキシンの体内動態には服用時刻の違いにより有意な差異が認められており、吸収速度は朝服用時に比べ、P 糖タンパク質の発現量が低下する夜間服用時に比べて上昇する<sup>4)</sup>。

マウス小腸における P 糖タンパク質の発現にも概日リズムが認められたが、マウス *Abcb1a* 遺伝子の発現リズムは、PAR bZip 転写因子である HLF およびその抑制因子である E4BP4 によって制御され、これら因子が転写の促進 (HLF) と抑制 (E4BP4) を交互に繰り返す結果、*Abcb1a* 遺伝子の発現に概日リズムを引き起こしていた<sup>5)</sup>。また、P 糖タンパク質以外にもマウスの消化管においては *Abcg2/Bcrp*, *Abcc2/Mrp2* などの ABC トランスポーターの発現に概日性的変動が認められた (図 2)。これらトランスポーターの発現リズムは CRE 配列を介して ATF4 によって制御されており、*Abcb1a* 遺伝子の発現リズムと同様の時間帯にピークを示した<sup>6)</sup>。

一方、腎臓は薬物の主な排泄臓器であるが、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<sup>7-9)</sup>。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あり、近位

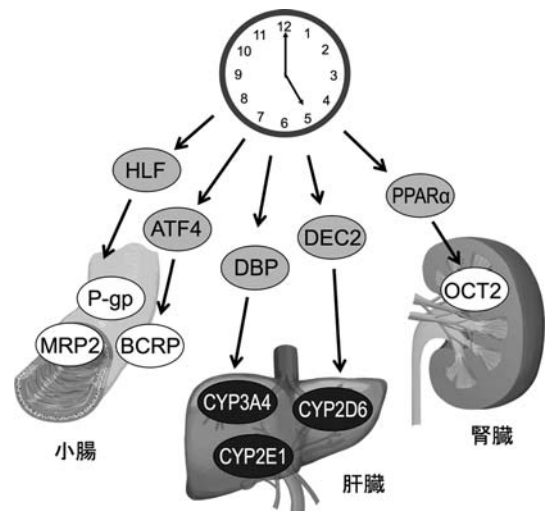


図 2 トランスポーター、薬物代謝酵素の概日リズム制御

概日時計機構を構成する時計遺伝子は、種々の転写因子を介して消化管、腎臓における薬物輸送トランスポーターや、肝臓における薬物代謝酵素 (CYPs) の発現に概日リズムを引き起こす。これら薬効の発現に関与する分子のリズムによって、薬物の病巣部位への移行性、生体内での半減期、細胞の薬剤感受性に概日性的変動が生じ、薬の効果や副作用の程度は服用する時刻によって変化する。

尿細管における薬物の排泄にはさまざまな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概日リズムに関する報告はないが、マウスにおいて organic cation transporter 2 (OCT2) をコードする *Slc22a2* 遺伝子の発現には概日変動が認められ、シスプラチンの腎クリアランスや腎細胞毒性に投薬時刻の違いによる差異を引き起こしていた<sup>10)</sup>。また、OCT2/*Slc22a2* の発現リズムは PPAR $\alpha$  を介して時計遺伝子によって制御されており、PPAR $\alpha$  のノックアウトマウスでは OCT2 の発現量が恒常的に低下し、シスプラチンの腎クリアランスは 1 日を通して低値を示した<sup>10)</sup>。

### 4. 肝薬物代謝の概日リズム

肝臓や小腸に発現するチトクローム P450 (CYPs) は、薬物の代謝に関与する主な酵素群であるが、肝臓で代謝される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 CYPs の活性にも概日性的変動があることが指摘されていた。しかしながら、CYPs タンパク質はヒトと実験動物 (マウス、ラット) で同種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ていた。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採取が困難であることから分子レベルでの解析が進んでいなかったが、培養ヒト肝細胞を用いた概日時計の *in vitro* 再構築系におい

て、薬物代謝酵素である *CYP3A4*, *CYP2D6*, *CYP2E1* の遺伝子発現には概日リズムが認められた<sup>11-13</sup>). *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 によって促進された。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したことから、*CYP3A4* 遺伝子の発現リズムも PAR bZip 転写因子を介してコアループ機構によって制御されていると考えられた (図 2). *CYP2D6* の発現リズムは C/EBP $\alpha$  (CCAAT enhancer binding protein $\alpha$ ) による転写の促進を DEC2 (differentiated embryo chondrocyte-2) が周期的に抑制することで引き起こされ (図 2), 再構築系の培養細胞内において *CYP2D6* の酵素活性にも概日性的変動が認められた。また、*CYP2E1* の発現リズムは HNF1 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor-1 $\alpha$ ) 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た (図 2)。

## 5. 細胞の抗がん剤感受性における概日リズム

薬物の効果は作用部位における「薬物の濃度」のみならず、その部位における「薬物に対する感受性」によっても左右される。スタチンなど高脂血症治療薬の標的酵素である HMG-CoA 還元酵素、モルヒネの鎮痛効果に関連するオピオイド  $\mu$  受容体、ブレオマイシンの肺毒性に関わる NRF2 などの発現には概日リズムが認められている。がん細胞の抗がん剤に対する感受性に概日リズムを引き起こす因子として、トポイソメラーゼ I, 葉酸還元酵素, mTOR などが知られている。p53 は紫外線照射などによる DNA の損傷時や抗がん剤曝露などによって細胞内に蓄積し、アポトーシスや細胞老化などを引き起こすが、我々は時計遺伝子が ATF4 を介して p53 の発現リズムを制御し、がん細胞の抗がん剤に対する感受性に時刻依存的な変化を引き起こすことを明らかにした<sup>14</sup>。

明暗周期環境下 (明期 12 時間, 暗期 12 時間) で飼育したマウスの皮下に線維芽細胞由来の腫瘍細胞 (UV. BAL-5.4G) を移植し、形成された腫瘍内における ATF4 の発現量を調べたところ、その発現は明期前半に高値を示す概日リズムを示した。ATF4 は細胞老化因子の一つである p19ARF (ヒトでは p14ARF) の発現を抑制するが<sup>15</sup>, ATF4 の発現が亢進する明期前半には p19ARF の発現量が低下し、MDM2 のユビキチンリガーゼ活性が亢進する結果、p53 タンパク質の分解が促進され、その発現量は減少した (図 3)。一方、ATF4 に発現が低下する暗期前半においては p19ARF の発現が上昇し、MDM2 のユビキチンリガーゼ活性が減弱する結果、p53 タンパク質の分解速度が低下して細胞内蓄積量は上昇した。このような腫瘍細胞内での p53 の発現リズムに伴い、抗がん剤の抗腫瘍効果には投薬

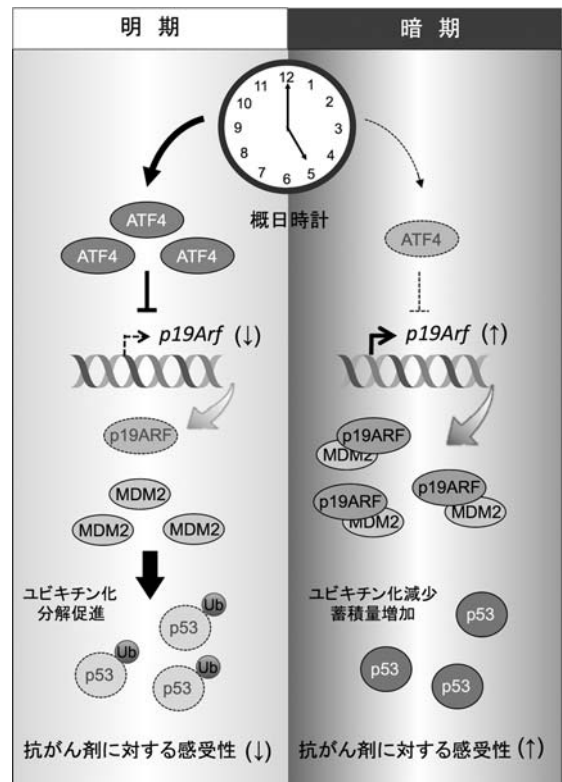


図 3 がん細胞の抗がん剤感受性の概日リズム制御

ATF4 は p19ARF の転写を周期的に抑制することで、その発現に概日リズムを生じさせる。p19ARF は MDM2 の活性を抑制して p53 の分解を阻害し、細胞内蓄積量を増大させる。そのため、ATF4 の発現が低い時間帯 (夜行性のマウスでは暗期) には、p53 の蓄積量が增大し、がん細胞の抗がん剤に対する感受性が向上する。

時刻の違いによる差異が認められた。すなわち、抗がん剤の殺細胞効果は、p53 の発現量が高値を示す時間帯 (暗期前半) に投与することで、より増強されることが明らかとなった (図 3)<sup>14</sup>。

## 6. おわりに

概日時計は強固なリズム発振機能と周囲環境の変化への柔軟な対応力とを兼ね備えたシステムである。本稿で取り上げたトランスポーターや代謝酵素などは、薬物の輸送や分解のために備わっているのではなく、本来は内因性の物質を基質として、エネルギー代謝や細胞・臓器の恒常性維持などのために機能している。生体は地球の自転に伴う外部環境の周期的な変化に効率よく対応するため、これら分子の発現や機能に概日性的変動を引き起こすシステム (概日時計) を獲得したと思われるが、このシステムによって結果的に薬物の病巣部位への移行性や細胞の感受性に服用時刻の違いによる差が生じる。そのため、この現象をうまく利用すれば、より効果的・効率的な薬物治療につながる

ことが期待できる。今後は、製剤技術などを駆使し、病状が悪化する時間帯に合わせて薬が放出されるようなドラックデリバリーシステムの開発が重要になるであろう。

- 1) Gachon, F., Olela, F.F., Schaad, O., Descombes, P., & Schibler, U. (2006) *Cell Metab.*, 4, 25-36.
- 2) Oishi, K., Shirai, H., & Ishida, N. (2005) *Biochem. J.*, 386, 575-581.
- 3) Koyanagi, S., Hamdan, A.M., Horiguchi, M., Kusunose, N., Okamoto, A., Matsunaga, N., & Ohdo, S. (2011) *J. Biol. Chem.*, 286, 32416-32423.
- 4) Erol, K., Kilic, F.S., Batu, O.S., & Yildirim, E. (2001) *Chronobiol. Int.*, 18, 841-849.
- 5) Murakami, Y., Higashi, Y., Matsunaga, N., Koyanagi, S., & Ohdo, S. (2008) *Gastroenterology*, 135, 1636-1644.
- 6) Hamdan, A.M., Koyanagi, S., Wada, E., Kusunose, N., Murakami, Y., Matsunaga, N., & Ohdo, S. (2012) *J. Biol. Chem.*, 287, 17224-17231.
- 7) Hrushesky, W.J., Borch, R., & Lévi, F. (1982) *Clin. Pharmacol. Ther.*, 32, 330-339.
- 8) Lévi, F., Metzger, G., Massari, C., & Milano, G. (2000) *Clin. Pharmacokinet.*, 38, 1-321.
- 9) Ferrazzini, G., Sohl, H., Robieux, I., Johnson, D., Giesbrecht, E., & Koren, G. (1991) *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 41, 425-427.
- 10) Oda, M., Koyanagi, S., Tsurudome, Y., Kanemitsu, T., Matsunaga, N., & Ohdo, S. (2014) *Mol. Pharmacol.*, 85, 715-722.
- 11) Takiguchi, T., Tomita, M., Matsunaga, N., Nakagawa, H., Koyanagi, S., & Ohdo, S. (2007) *Pharmacogenet. Genomics*, 17, 1047-1056.
- 12) Matsunaga, N., Inoue, M., Kusunose, N., Kakimoto, K., Hamamura, K., Hanada, Y., Toi, A., Yoshiyama, Y., Sato, F., Fujimoto, K., Koyanagi, S., & Ohdo, S. (2012) *Mol. Pharmacol.*, 81, 739-747.
- 13) Matsunaga, N., Ikeda, M., Takiguchi, T., Koyanagi, S., & Ohdo, S. (2008) *Hepatology*, 48, 240-251.
- 14) Horiguchi, M., Koyanagi, S., Hamdan, A.M., Kakimoto, K., Matsunaga, N., Yamashita, C., & Ohdo, S. (2013) *Cancer Res.*, 73, 2639-2649.
- 15) Horiguchi, M., Koyanagi, S., Okamoto, A., Suzuki, S.O., Matsunaga, N., & Ohdo, S. (2012) *Cancer Res.*, 72, 395-401.

#### 著者寸描

##### ●小柳 悟 (こやなぎ さとる)

九州大学薬学研究院薬剤学分野准教授。博士(薬学)。

■略歴 1971年福岡県に生る。95年福岡大学大学薬学部卒業。97年九州大学大学院薬学研究科修士課程修了。2000年同大学院博士課程修了。00~05年福岡大学薬学部生化学教室助手。05年より現職。

■研究テーマと抱負 体内時計と薬効・疾患関連因子の概日リズムとの関連から、薬の至適投与法(時間治療)や新規治療標的分子の探索を目指している。

■ウェブサイト <http://yakuzai.phar.kyushu-u.ac.jp>

■趣味 ランニング, 寺社巡り。