

令和元年6月4日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08380

研究課題名(和文) ヒト肝および腎フラビン含有酸素添加酵素の薬物相互作用を考慮した医薬品体内動態予測

研究課題名(英文) Pharmacokinetics prediction of drugs in humans associated with flavin-containing monooxygenase dependent-oxygenations in livers and kidneys of animal models

研究代表者

清水 万紀子 (SHIMIZU, Makiko)

昭和薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：90307075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：フラビン含有酸素添加酵素(FMO)は化学物質、食品由来成分および医薬品などの窒素および硫黄原子の酸化反応を触媒する。ヒト肝FMO3に関する薬物代謝消失や薬物相互作用の情報は増えつつあるが、FMOが医薬品の全身における消失に影響するか否かの情報は十分ではない。本研究ではヒト肝細胞を移植されたヒト化マウスや非ヒト霊長類モデル動物を用いて検討を行った。ヒト肝移植マウスおよび小型の非ヒト霊長類であるマーモセットでは肝と腎臓におけるFMOの役割を考慮する必要があり、サルではヒトに類似していることが推察され、FMOを介した薬物相互作用を検討するうえで有用であることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、肝のみならず腎の酸素添加酵素活性を考慮する点に学術的意義がある。医薬品開発で用いられている実験動物の肝および腎のFMO各分子種の触媒活性および薬物相互作用の情報は少なく、FMOの関与する薬物の体内動態の詳細を明らかにすることは、FMOが代謝を触媒する医薬品の開発を進める上で意義深いと考える。さらに、FMO3によって食品由来成分トリメチルアミンから生成するN酸化体は動脈硬化悪化が提唱されており、疾患の影響因子として基盤となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The flavin-containing monooxygenase (FMO) is an NADPH-dependent enzyme that catalyzes the oxygenation of a wide variety of nitrogen- and sulfur-containing medicines and xenobiotic substances. Human FMO3 and FMO1 are considered prominent functional forms expressed in adult livers and kidney, respectively. FMO dependent oxygenation activities in humanized-liver mice, marmoset, and monkey were determined. The oxidation rates of FMO substrate in mouse kidney may need to be taken into consideration when directly scaling up without consideration of an interspecies factor between in vitro hepatic clearances and in vivo clearances of FMO probe drugs in humanized-liver mice. Expression of FMO1 and FMO3 mRNA were determined in the marmoset liver and kidney. Monkey FMO1 was expressed and functional in kidneys, similar to human FMO1. These results suggest that investigation of drug-drug or drug-food interactions associated with FMO enzymes could be evaluated in non human primate models.

研究分野：薬物代謝学、薬物動態学

キーワード：フラビン含有酸素添加酵素 FMO

## 1. 研究開始当初の背景

薬物代謝酵素フラビン含有酸素添加酵素(FMO)は生体異物の第一相代謝反応においてシトクロム P450 について重要な役割を果たしている。そのうち、ヒト成人肝 FMO の主要分子種は FMO3 である。FMO3 は食品由来トリメチルアミン等の幅広い化学物質、ベンジダミン、オランザピン、メチマゾールやスリダクなど医薬品の N-および S-酸化反応を触媒する。2012 年に発売された糖尿病薬 (DPP-4 阻害薬) テネリグリプチンが主に FMO3 で代謝されることが報告されている。さらに、欧米人において FMO3 の典型的基質であるトリメチルアミンの代謝物トリメチルアミン N-酸化体が動脈硬化症の悪化に影響する報告がされ、生体への影響が注目されている (Koeth et al., Nat Med, 2013)。FMO3 はヒト肝のタンパク含量や酵素活性に約数十倍におよぶ大きな個人差が確認されている。筆者らは FMO3 酵素機能低下が原因となる疾患であるトリメチルアミン尿症に関する以下の研究を行ってきた。すなわち、日本人の自己申告トリメチルアミン尿症被験者の FMO3 遺伝子のコーディング領域の解析を行い、日本人の新規遺伝子変異を 12 種見出し、その組換え酵素の触媒活性を報告してきた (Shimizu et al., Mol Genet Metab, 2012; Drug Metab Dispos, 2007)。さらに、トリメチルアミンの無臭化の個人内変動について、日本人成人女性および小児の生体試料を用いて明らかにした (Shimizu et al., BMC Med Genet, 2007; Brit J Clin Pharmacol, 2011)。一方、成人腎には胎児肝に発現する FMO1 が発現している (Zhang et al., Drug Metab Dispos, 2006)。FMO1 はラット肝臓に発現しており、ヒトとの種差が存在している (Yamazaki, Shimizu et al., Biochem Pharmacol, 2013)。FMO3 の薬物-薬物相互作用の可能性について組換え酵素を用いてスリダクスルフィド S-酸化酵素活性に対するメチマゾールの影響を *in vitro* で検討した (Yamazaki, Shimizu, Biochem Pharmacol, 2013)。その結果、FMO3 変異型酵素は野生型に比較して阻害定数が低くなることが明らかとなった。さらに、各種実験動物の FMO1 および 3 の組換え酵素を作成し、これらがヒト FMO の基質を代謝しうることを明らかにした (Yamazaki, Shimizu et al., Biochem Pharmacol, 2014)。ヒト肝 FMO3 に関する薬物代謝消失や薬物相互作用の情報は増えつつあるが、FMO1 が医薬品の全身における消失に影響するか否かの情報は十分ではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、各種動物組換え FMO 酵素ならびに肝および腎ミクロゾームを用いて各種医薬品への酸素添加反応における FMO1 および 3 の寄与と薬物相互作用を *in vitro* および *in vivo* で明確にすることを目的とし、*in vivo* における薬物相互作用の予測に有用な動物モデルの検討を行うために、ヒト肝細胞を移植されたヒト化マウスや非ヒト霊長類モデル動物を用いた。

## 3. 研究の方法

ヒト肝移植および非移植マウスにベンジダミンおよびトリメチルアミン d9 体を経口投与し、基質と酸化的代謝物の血中濃度を測定し、*in vivo* プローブとしての有用性を評価した。簡素な生理学的薬物動態 (PBPK) モデル手法で FMO 基質および代謝物の動物およびヒト血中濃度推移の予測を試みた。実験動物を用いた *in vitro* 薬物相互作用の検討を行うために、マーモセットおよびカニクイザルの肝および腎の FMO 発現量および酵素活性を検討した。

## 4. 研究成果

ヒトおよび動物の生体内薬物酸化における FMO3 の寄与を検討するため、ヒト肝移植および非移植マウスにトリメチルアミン d9 体を経口投与し、基質とトリメチルアミン N-酸化体の血中濃度を測定し、簡素な PBPK モデル手法でトリメチルアミンのヒト血中濃度推移の予測を試みた。さらに、ラット血中トリメチルアミン動態から簡易 PBPK モデル手法よりヒト血中濃度推移の予測も試みた。比較すると、ラットはトリメチルアミンの酸化的代謝が低く、ヒトとの乖離があった。ヒト肝移植マウスにおけるトリメチルアミン d9 体の N-酸化体血中動態特性から、コントロールマウスに比較してヒト肝移植マウスは高い N-酸化体生成が認められた。以上、ヒト肝移植マウスはヒトのトリメチルアミン代謝のモデルとして有用であることが推察された。近年、生体内のトリメチルアミン N-酸化体が動脈硬化症の進展に関係するとした報告があることから、これらの PBPK モデルは日常化におけるトリメチルアミン摂取と血中トリメチルアミン N-酸化体濃度との関係を予測するのに有用であると推察された。

ヒトおよび動物の生体内薬物酸化における FMO1 と FMO3 の寄与を検討するため、ヒト肝移植および非移植マウスにベンジダミンを経口投与し、基質と 2 つの酸化的代謝物の血中濃度を測定し、*in vivo* プローブとしてのベンジダミンの有用性を評価した。マウスおよびヒトの肝および腎ミクロゾームによるベンジダミンの酸化的代謝物を測定した。動物データを元に簡素 PBPK モデル手法でベンジダミンのヒト血中濃度推移の予測を試みた。ヒト肝移植マウスでの本薬血中動態特性から、簡素 PBPK モデル手法によりヒト仮想経口投与血中濃度推移を得るには、移植したヒト肝以外のマウスとヒトの代謝消失の種差を考慮する必要があった。マウス腎の高 FMO 活性に依存しうる乖離を定量的に解決する一法として、ヒト肝細胞移植前のマウス由来肝細胞を不活化した TK-NOG マウスでのベンジダミン動態実測値を得て、ヒト肝移植マウスからヒトへ本薬血中動態予測を補正する方法が考えられた。

近年実験動物として注目されている、小型霊長類マーモセットの肝および腎の FM01 および FM03 の mRNA 発現を検討した。マーモセット肝および腎には FM01 および FM03 が同程度発現しており、性差は認められなかった。このことから、マーモセットは FM0 基質を投与した場合、マウスのように腎における代謝を考慮した血中薬物濃度予測を行う必要があると推察された。

サル腎の FM01 含量の定量および FM0 基質であるベンジダミン N-酸化酵素活性測定を行った。その結果、サル腎の FM01 含量および酵素活性に性差は認められなかった。サル腎の FM03 タンパク質含量は検出限界以下であった。ヒト腎には FM03 がほとんど発現していないことから、サルはヒトのモデルとして有用であると推察された。ヒトの FM03 には遺伝子多型が存在し、それらの変異をホモで有するヒトは表現型としてトリメチルアミン尿症を呈する場合がある。体臭を訴えるボランティアから新規 FM03 遺伝子変異 5 種および新規ハプロタイプ 2 種を見出した。大腸菌発現系を用いてこれらの変異タンパクの機能低下を明らかにした。一方、実験動物の FM03 遺伝子多型に関する情報は少ない。そこで、サル腎の FM03 遺伝子配列を検索し、18 種の遺伝子変異を見出した。これらの変異の頻度はサルの産地によって一部、差があった。サル変異 FM03 のベンジダミン N-酸化酵素活性を測定した結果、一部は野生型に比較して低値を示した。以上の検討から、動物およびヒトにおける FM0 基質の体内動態および薬物相互作用の予測を行ううえで、肝外組織における複数の FM0 分子種の寄与を酸化反応毎に考慮する必要があると推察された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Shimizu, M., Yoda, H., Igarashi, N., Makino, M., Tokuyama, E., and Yamazaki, H. Novel variants and haplotypes of human flavin-containing monooxygenase 3 (FM03) gene associated with Japanese subjects suffering from trimethylaminuria. *Xenobiotica*, in press. doi: 10.1080/00498254.2018.1539279. 査読有

Uno Y, Shimizu M, Yoda H, Yamazaki H. Expression and metabolic activity of flavin-containing monooxygenase 1 (FM01) in cynomolgus macaque kidney. *J.Med.Primatol.*, 48, 51-53, 2019. doi: 10.1111/jmp.12385. 査読有

Uno, Y., Shimizu, M., Yoda, H., Origuchi, Y., and Yamazaki, H. Non-synonymous genetic variants of flavin-containing monooxygenase 3 (FM03) in cynomolgus macaques. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 34, 104-109, 2019. doi: 10.1016/j.dmpk.2018.09.001. 査読有

Shimizu, M., Suemizu, H., Mizuno, S., Kusama, T., Miura, T., Uehara, S., and Yamazaki, H. Human plasma concentrations of trimethylamine N-oxide extrapolated using pharmacokinetic modeling based on metabolic profiles of deuterium-labeled trimethylamine in humanized-liver mice. *J.Toxicol. Sci.*, 43, 387-393, 2018. doi: 10.2131/jts.43.387. 査読有

Yamazaki-Nishioka, M., Shimizu, M., Suemizu, H., Nishiwaki, M., Mitsui, M., and Yamazaki, H. Human plasma metabolic profiles of benzydamine, a flavin-containing monooxygenase probe substrate, simulated with pharmacokinetic data from control and humanized-liver mice. *Xenobiotica*, 48, 117-123, 2018. doi: 10.1080/00498254.2017.1288280. 査読有

Uehara S, Shimizu M, Uno Y, Inoue T, Sasaki E, Yamazaki H. Marmoset Flavin-Containing Monooxygenase 3 in the Liver Is a Major Benzydamine and Sulindac Sulfide Oxygenase. *Drug Metab Dispos.*, 45, 497-500, 2017. doi: 10.1124/dmd.117.075184. 査読有

Shimizu M, Yamazaki H. Human plasma and urinary metabolic profiles of trimethylamine and trimethylamine N-oxide extrapolated using a simple physiologically based pharmacokinetic model. *J. Toxicol. Sci.*, 42, 485-490, 2017. doi: 10.2131/jts.42.485. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

Makiko Shimizu and Hiroshi Yamazaki: Drug oxidations mediated by polymorphic Flavin-containing monooxygenase, The 21st International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations. 2016 年, USA, California, UC Davis Conference center

清水万紀子、末水洋志、三井満里奈、山崎美穂、山崎浩史: フラビン含有酸素添加酵素お

よびチトクロム P450 の共通基質ベンジダミンのヒト肝移植マウスを用いた in vivo 血中動態予測, 第 37 回日本臨床薬理学会学術総会, 2016 年, 米子

三井満里奈、清水万紀子、山崎美穂、末水洋志、山崎浩史: ヒト肝細胞移植マウスの薬物血中濃度および生理学的薬物動態モデルを組み合わせたヒト薬物血中濃度推移予測, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年, 仙台

清水万紀子、依田紘美、五十嵐成美、武井まどか、中莖昂明、山崎浩史: 日本人トリメチルアミン尿症の一因となる新規フラビン含有モノオキシゲナーゼ 3 変異型酵素の触媒機能, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年, 仙台

Makiko Shimizu, Hiroshi Suemizu, and Hiroshi Yamazaki: Metabolic Profiles of Benzydamine in Humanized-liver Mice, 21st North American ISSX Meeting, 2017, Rhode Island

Hiroshi Yamazaki, Hiroshi Suemizu, and Makiko Shimizu: Human plasma and urinary metabolic profiles of trimethylamine and its N-oxide extrapolated using humanized-liver mice and simple physiologically based pharmacokinetic models, SOT 57th Annual Meeting and ToxExpo, 2018, Texas

中莖昂明、清水万紀子、菱沼英史、平塚真弘、山崎浩史: 東北メディカル・メガバンク統合データベースより見出された新規フラビン含有モノオキシゲナーゼ 3 遺伝子変異の組換え酵素を用いた機能解析, 日本薬学会第 138 年会, 2018, 金沢

Makiko Shimizu, Komei Nakakuki, Hiromi Yoda, Masahiro Hiratsuka, and Hiroshi Yamazaki: Mutations of flavin-containing monooxygenase 3 (FM03) gene in Japanese cohorts, 22nd North American ISSX Meeting, 2018, Canada

Makiko Shimizu, Komei Nakakuki, Hiromi Yoda, Masahiro Hiratsuka, and Hiroshi Yamazaki: Genetic Polymorphisms of Flavin-containing Monooxygenase 3 Gene in Japanese Cohorts, International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX, 2018, 金沢

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 山崎浩史

ローマ字氏名: YAMAZAKI, hiroschi

所属研究機関名: 昭和薬科大学

部局名: 薬物動態学研究室

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 30191274

研究分担者氏名: 村山典恵

ローマ字氏名: MURAYAMA, norie

所属研究機関名: 昭和薬科大学

部局名: 薬物動態学研究室

職名: 講師

研究者番号 (8 桁): 90219949

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。