

令和 2 年 4 月 22 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08425

研究課題名(和文) サリドマイドとアミノ基置換体のヒト化動物とヒト胎盤細胞による体内代謝的活性化評価

研究課題名(英文) Relevance to bioactivation and toxicity of thalidomide, pomalidomide, and lenalidomide by human cytochrome P450 3A enzymes in cultured placental cells and humanized-liver mice

研究代表者

山崎 浩史 (YAMAZAKI, Hiroshi)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30191274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト胎盤とヒト肝細胞を組合わせた系を活用し、活性化と解毒のバランスの上でサリドマイドの基本骨格であるフタル酸エステル類の反応性代謝物を補足し、ヒト特有な毒性発現バイオマーカーを *in vitro* および *in vivo* にて詳細に解析した。*In vitro* で認められたヒト胎盤における P450 3A 酵素の自己誘導を伴うサリドマイドの 5-ヒドロキシサリドマイドへの活性化は、肝および胎盤が複雑に連携する *in vivo* 状態でも起こりうる事が推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

In vitro で認められたヒト胎盤における P450 3A 酵素の自己誘導を伴うサリドマイドの 5-ヒドロキシサリドマイドへの活性化は、肝および胎盤が複雑に連携する *in vivo* 状態でも起こりうる事が推察された。肝集積を含む経口投与後の体内動態を記述するモデルを活用し、活性化と解毒のバランスを考慮の上、物質と生体中濃度を双方に予測しうることを明かにした。一般化学物質の経口吸収後の臓器移行性が、肝毒性などの臓器毒性発現に一部関与していることが推定された。

研究成果の概要(英文)：Evidence has been presented for auto-induced human cytochrome P450 3A enzyme involvement in the teratogenicity and clinical outcome of thalidomide due to oxidation to 5-hydroxythalidomide and subsequent metabolic activation in livers. Human placental BeWo cells, cultured in the recommended media, also indicated detectable thalidomide 5-hydroxylation activities. Thalidomide significantly induced P450 3A4/3A5, 2B6, and pregnane X receptor (PXR) mRNA levels 2 to 3-fold. Activation of thalidomide to 5-hydroxythalidomide with autoinduction of P450 3A enzymes in human placentas, as well as livers, is suggested *in vivo*.

研究分野：薬物動態学

キーワード：サリドマイド ポマリドマイド レナリドマイド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、肝障害にて市場から撤退したトログリタゾン、特異体質の肝障害を引き起こすフルタミドおよび開発候補品 OT-7100 一次代謝物を用いヒト特異性肝毒性の原因と考えられる反応性代謝物が、ヒト肝細胞移植マウス生体中にて、多様なヒト肝タンパク質分子種に非特異的に結合することを、二次元電気泳動によるプロテオミクス的手法と加速器型質量分析による超低濃度 ^{14}C 放射能測定を組合わせて明らかにした (*Toxicol Res*, 4, 106, 2015)。TK-NOG マウス (*Biochem Biophys Res Commun*, 405, 405, 2011) は、国内で先行利用された uPA マウスとは異なり、ヒト P450 3A 人工染色体導入マウス (*Sci Rep* 6, 21419, 2016) と同様に、次世代に亘る研究が可能な特徴をもつことが分かっている。研究代表者は、先行研究にてヒトの臨床適応量を考慮した 100 mg/kg 体重サリドマイドをヒト肝保有マウスとヒト肝非保有マウスにそれぞれ経口投与し、経時的に採血した検体より、サリドマイドの血中濃度推移からみた体内動態の基盤的情報を得ている (*Chem Res Toxicol*, 28, 2088, 2015)。

2. 研究の目的

サリドマイドの動物種差のある胎児毒性について、代謝的活性化の観点から、ヒト型モデル動物肝あるいはヒト胎盤由来酵素のどちらが触媒する医薬品由来反応性代謝物生成が主な原因となるかを検討することとした。健康人胎盤とヒト肝保有マウスを用いた比較実験から、母体側のヒト P450 3A あるいはヒト肝細胞が触媒するヒト型代謝反応と、ヒト胎盤あるいは胎盤由来培養細胞を試験管内酵素源とする活性化・解毒反応に着目することで、サリドマイド類の代謝的活性化あるいは解毒化の意義を明かにすることを目指した。芳香環にアミノ基を導入したポマリドマイドあるいはケトン基を除去したレナリドマイドもげっ歯類でも催奇形性を示すことからフタル酸骨格の医薬候補品の次世代の代謝的活性化メカニズムを薬物体内動態の視点から調べ、反応性代謝物の生成機構研究を通して、ヒト安全性評価において標準化モデル構築を試みた。フタル酸骨格をもつ次世代医薬品や一般化学物質の毒性発現メカニズムを薬物体内動態の観点から調べ、薬物の代謝的活性化にともなう変動する *in vitro* および *in vivo* バイオマーカー探索を通じ、代謝的活性化の視点に立った生理的薬物動態モデルを含む医薬品リスク評価システムの構築も行うことを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト肝と自然分娩で得られるヒト胎盤、培養可能なヒト肝および胎盤由来細胞系、さらにヒト型モデルマウスを酵素源あるいは生体モデルとして組合わせ、母胎におけるサリドマイドとアミノ基導入ポマリドマイドとそれらの一次代謝物を基質とした代謝活性化・解毒反応のバランスを評価した。ヒト肝と胎盤、培養細胞系、あるいはヒト肝細胞移植妊娠可能マウスを組み合わせ、母体と胎児のサリドマイド類の代謝的活性化機能とヒト型反応性代謝物の新たな医療薬学的・毒性学的評価を行った。ヒト胎盤標本およびヒト胎盤由来 BeWo 細胞を *in vitro* 酵素源として、サリドマイド関連化合物群の代謝的活性化と酵素誘導を評価した。ヒト胎盤とヒト肝細胞を組合わせた系を活用し、活性化と解毒のバランスの上でサリドマイドの基本骨格であるフタル酸エステル類の反応性代謝物を補足し、ヒト特有な毒性発現バイオマーカーを *in vitro* および *in vivo* にて詳細に解析した。反応性代謝物の検索は、サリドマイドの芳香環が二重に酸化された後のグルタチオン付加体を LC-MS/MS にて捕捉した実績のある分離分析法を活用した。

4. 研究成果

ヒト肝と自然分娩で得られるヒト胎盤、培養可能なヒト肝および胎盤由来細胞系、さらにヒト型モデルマウスを酵素源あるいは生体モデルとして組合わせ、サリドマイドやアミノ基導入ポマリドマイドとケトン基を除去したレナリドマイドの代謝活性化・解毒反応のバランスや薬物体内動態を評価した。ヒト胎盤標本および胎盤 BeWo 細胞は、低いながらも検出可能な P450 3A4/5 mRNA 発現および薬物酸化活性を示した。複数の個体別に得られたヒト胎盤マイクロソーム画分は、検出可能なミダゾラム 1'- および 4-ヒドロキシル化およびサリドマイド 5-ヒドロキシル化活性を示した。推奨培地で培養したヒト胎盤 BeWo 細胞も、検出可能なミダゾラムの 1'- および 4-水酸化およびサリドマイド 5-水酸化活性を示した。推奨培地に使用される内因性ホルモンによるマスキング効果を減少させるために、5%チャコール処理ウシ胎児血清を含有する改変培地と共に培養した胎盤 BeWo 細胞において、P450 3A4/5 mRNA の誘導および酸化活性が認められた。サリドマイドは、P450 3A4/3A5、2B6、およびプレグナン X 受容体 (PXR) mRNA レベルを 2-3 倍有意に誘導したが、リファンピシンは改変培地条件下で P450 3A5 および PXR mRNA のみを増強した。これらの修飾条件下では、サリドマイドはミダゾラムの 1'-ヒドロキシル化およびサリドマイドの 5-ヒドロキシル化活性を 3 倍有意に誘導したが、プロピオンヒドロキシル化活性は誘導しなかった。以上を小括すると、*in vitro* で認められたヒト胎盤における P450 3A

酵素の自己誘導を伴うサリドマイドの 5-ヒドロキシサリドマイドへの活性化は、肝および胎盤が複雑に連携する *in vivo* 状態でも起こりうる事が推察された。

フタル酸骨格を有する一般化学物質にも着目した。ヒト環境に検出されるフタル酸ジエステル類をヒト肝細胞移植マウスに経口単回投与すると、ヒト型の代謝物や胆汁/尿中排泄の動態が確認された。動物またはヒト用生理学的薬物動態モデルを活用した仮想投与量を設定し、血中および肝臓中濃度推移を予測したところ、一定量を仮想単回経口投与後の動物血中濃度時間曲線下面積値は、選択した化合物のコンパートメントおよび生理学的薬物動態モデルでの前向き出力が一致した。一方、ヒト集団試料のバイオモニタリング報告値を定常状態の平均濃度と見なし、環境汚染物質フタル酸エステル類の生理学的薬物動態モデルを用い、一日あたりの摂取量を逆算する研究をまとめることができた。肝集積を含む経口投与後の体内動態を記述するモデルを活用し、活性化と解毒のバランスを考慮の上、物質量と生体中濃度を双方向に予測しうることを明かにした。これらのことから、一般化学物質の経口吸収後の臓器移行性が、肝毒性などの臓器毒性発現に一部関与していることが推定された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miura, T. Suemizu, H. Goto, M. Sakai, N. Iwata, H. Shimizu, M. Yamazaki, H	4. 巻 49
2. 論文標題 Human urinary concentrations of monoisononyl phthalate estimated using physiologically based pharmacokinetic modeling and experimental pharmacokinetics in humanized-liver mice orally administered with diisononyl phthalate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Xenobiotica	6. 最初と最後の頁 513-520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00498254.2018.1471753	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miura, T, Uehara, S, Mizuno, S, Yoshizawa, M, Murayama, N, Kamiya, Y, Shimizu M, Suemizu, H, Yamazaki, H	4. 巻 32
2. 論文標題 Steady-state human pharmacokinetics of monobutyl phthalate predicted by physiologically based pharmacokinetic modeling using single-dose data from humanized-liver mice orally administered with dibutyl phthalate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 333-340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.chemrestox.8b00361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamazaki, H. Kamiya, Y.	4. 巻 4
2. 論文標題 Extrapolation of Hepatic Concentrations of Industrial Chemicals Using Pharmacokinetic Models to Predict Hepatotoxicity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicol Res	6. 最初と最後の頁 295-301
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5487/TR.2019.35.4.295	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murayama N, Suemizu H, Uehara S, Kusama T, Mitsui M, Kamiya Y, Shimizu M, Guengerich FP, Yamazaki H	4. 巻 43
2. 論文標題 Association of pharmacokinetic profiles of lenalidomide in human plasma simulated using pharmacokinetic data in humanized-liver mice with liver toxicity detected by human serum albumin RNA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 369-375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.43.369	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Murayama, N. and Yamazaki, H.	4. 巻 43
2. 論文標題 Cytochrome P450-dependent drug oxidation activities in commercially available hepatocytes derived from human induced pluripotent stem cells cultured for 3 weeks	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J.Toxicol.Sci.	6. 最初と最後の頁 241-245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2131/jts.43.241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miura, T., Uehara, S., Mizuno, S., Yoshizawa, M., Murayama, N., Kamiya, Y., Shimizu, M., Suemizu, H., and Yamazaki, H	4. 巻 33
2. 論文標題 Steady-state human pharmacokinetics of monobutyl phthalate predicted by physiologically based pharmacokinetic modeling using single-dose data from humanized-liver mice orally administered with dibutyl phthalate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem. Res. Toxicol.	6. 最初と最後の頁 333-340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.8b00361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miura T, Suemizu H, Goto M, Sakai N, Iwata H, Shimizu M and Yamazaki H.	4. 巻 49
2. 論文標題 Human urinary concentrations of monoisononyl phthalate estimated using physiologically based pharmacokinetic modeling and experimental pharmacokinetics in humanized-liver mice orally administered with diisononyl phthalate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Xenobiotica	6. 最初と最後の頁 513-520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00498254.2018.1471753	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu M, Suemizu Hi, Mitsui M, Shibata N, Guengerich FP, Yamazaki H	4. 巻 47
2. 論文標題 Metabolic profiles of pomalidomide in human plasma simulated with pharmacokinetic data in control and humanized-liver mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Xenobioca	6. 最初と最後の頁 844 ~ 848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00498254.2016.1247218	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Murayama N, Kazuki Y, Satoh D, Arata K, Harada T, Shibata N, Guengerich FP, Yamazaki H	4. 巻 42
2. 論文標題 Induction of human cytochrome P450 3A enzymes in cultured placental cells by thalidomide and relevance to bioactivation and toxicity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Toxicol. Sci.	6. 最初と最後の頁 343 ~ 348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.42.343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wani Tasaduq H., Chakrabarty Anindita, Shibata Norio, Yamazaki Hiroshi, Guengerich F. Peter, Chowdhury Goutam	4. 巻 30
2. 論文標題 The Dihydroxy Metabolite of the Teratogen Thalidomide Causes Oxidative DNA Damage	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chem. Res. Toxicol.	6. 最初と最後の頁 1622 ~ 1628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.7b00127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamazaki Hiroshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Differences in Toxicological and Pharmacological Responses Mediated by Polymorphic Cytochromes P450 and Related Drug-Metabolizing Enzymes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chem. Res. Toxicol.	6. 最初と最後の頁 53 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.6b00286	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Hiroshi Yamazaki and Norie Murayama
2. 発表標題 Roles of human Cytochrome P450 enzymes in drug oxidation: Comparison of in vitro and in vivo system results
3. 学会等名 21th International Conference on Cytochrome P450 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Yamazaki
2. 発表標題 Human drug metabolism and disposition in humanized-liver mice and non-human primate models
3. 学会等名 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Yamazaki
2. 発表標題 Human drug metabolism in humanized-liver mice and non-human primate models
3. 学会等名 20th International Conference on Cytochrome P450 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Hiroshi Yamazaki	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 6
3. 書名 Comprehensive Medicinal Chemistry III: ADME and Toxicology Yamazaki, H. Drug Metabolizing Enzyme Systems I	

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等 昭和薬科大学山崎浩史
<http://www.shoyaku.ac.jp/research/laboratory/doutai/teacher/96>

ORCID ID (0000-0002-1068-4261)
<http://orcid.org/0000-0002-1068-4261>

Researcher ID: A-6081-2011
<http://www.researcherid.com/rid/A-6081-2011>

Scopus Author ID: 57193405959
<http://www.scopus.com/authid/detail.url?authorId=57193405959>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村山 典恵 (MURAYAMA Norie) (90219949)	昭和薬科大学・薬学部・講師 (32624)	
研究分担者	清水 万紀子 (SHIMIZU Makiko) (90307075)	昭和薬科大学・薬学部・准教授 (32624)	