

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790120

研究課題名（和文） ヒトにおける薬物誘導性肝障害の評価システムの開発と応用

研究課題名（英文） Development and application of evaluation system for drug-induced hepatotoxicity in human

研究代表者

加藤 美紀 (KATOH MIKI)

名城大学・薬学部・准教授

研究者番号：70345594

研究成果の概要：

薬物性肝障害のメカニズムの一つに代謝的活性化がある。薬物代謝を担う主要な酵素であるチトクロム P450 (CYP) はヒト初代培養肝細胞やヒト肝癌由来細胞では極めて発現量が低い。そのため代謝的活性化を予測することは非常に困難である。そこで本申請課題において、ヒト肝癌由来細胞である HepG2 細胞と CYP3A4 発現系マイクロソームを用いて CYP3A4 による代謝的活性化を予測する測定系を構築した。本測定系を用いて代謝的活性が認められたベンゾジアゼピン系薬物に焦点を絞り検討を行った。ベンゾジアゼピン系薬物の中でも、7 位にニトロ基を有するニトロベンゾジアゼピンのみが CYP3A4 により特異的に代謝的活性化を受けることを明らかにした。本研究により、CYP3A4 による代謝的活性化がニトロベンゾジアゼピンの肝障害メカニズムの一つであることが示唆できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：代謝的活性化、チトクロム P450、CYP3A4、肝障害

1. 研究開始当初の背景

医薬品開発において最も頻繁に発生し、かつ大きなダメージとなる問題は、臨床試験における予期せぬ副作用の発現である。近年、候補化合物の開発を中止する原因で顕著な増加傾向にあるものは、非臨床および臨床における薬物誘導性の毒性発現である (Nat Rev Drug Discov 3: 711-715, 2004)。特に肝障

害については重大な問題になっている。多くの動物試験および in vitro 試験をクリアした安全性の高い候補化合物をヒトに投与しても、重篤な肝障害が発現するという問題は、早期に克服せねばならない重要課題の一つである。

これまで、薬物誘導性の肝障害については様々な視点からのアプローチがなされてき

た。薬物誘導性肝障害の発症メカニズムで最も重要なものの一つに、薬物代謝酵素による「代謝的活性化」、すなわち生成した代謝物あるいは中間代謝物による肝障害が挙げられる。医薬品開発時には実験動物を用いて毒性試験が実施されるが、薬物代謝反応には大きな種差が存在する。そのため、実験動物を用いたモデルでは「ヒト」の薬物代謝反応に基づく「代謝的活性化」による薬物誘導性肝障害の予測は極めて困難である。申請者はこれまで、ヒトにおける薬物代謝反応の予測について研究してきた。一般的に薬物代謝反応の検討にはヒト肝由来試料であるヒト肝ミクロソームやヒトヘパトサイトが使用される。しかし、肝ミクロソームでは細胞毒性を評価できず、また、ヘパトサイトでは薬物代謝酵素の発現が培養後、急激に減少するため、代謝的活性化による細胞障害を評価するのは難しいのが現状である。ヒト肝癌由来細胞ではヒト薬物代謝酵素の発現はほとんど認められず、親化合物の細胞毒性について検討できるが、代謝的活性化を評価できない。ヒト由来試料を用いた *in vitro* 実験系においても、薬物代謝能が極めて低いため、ヒトにおける代謝的活性化による薬物誘導性肝障害の予測は極めて困難である。すなわち、現状ではヒトでの代謝的活性化による薬物誘導性肝障害を評価できる適切な実験系が存在しない。

そこで、薬物代謝活性を有するヒト肝由来細胞実験系を構築し、医薬品開発における代謝的活性化による肝毒性評価システムを開発することが必要で、かつ急務であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は薬物代謝反応の中心を担うチトクロム P450 (CYP) を中心に、ヒトでの代謝的活性化による薬物誘導性肝障害に焦点を絞って、ヒトでの代謝的活性化による薬物誘導性肝障害の早期発見を目的とした肝毒性予測系の構築を目的とした。

(1) ヒト肝と同程度の CYP 代謝能を有し、かつ、細胞毒性評価が可能な *in vitro* 実験系を構築する。ヒト CYP 発現系ミクロソームとヒト肝由来細胞を組み合わせた実験系を構築する。

(2) (1) で構築した実験系を用いて細胞障害性を検討し、薬物の代謝的活性化による肝毒性予測系の評価を行う。

3. 研究の方法

(1) 試薬

バキュロ CYP3A4 発現ミクロソーム、コントロールミクロソームは BD-Gentest (Woburn, MA, USA) より購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は インビトロジェン (Melbourne,

Australia) 、DMEM は 日水製薬 (Tokyo, Japan) から入手した。NADPH は オリエンタル酵母 (Tokyo, Japan) から購入した。トログリタゾン は 第一三共株式会社 (Tokyo, Japan) より御供与頂いた。Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay Kit は プロメガ (Madison, WI, USA) から、Cell Counting Kit-8 は 和光純薬工業 (Osaka, Japan) から購入した。その他の試薬は 和光純薬工業ならびに Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。

(2) 細胞生存率の検討

細胞生存率は CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (ATP 測定法) と CellTiter-Blue Cell Viability Assay (MTT 測定法) の 2 種類で検討した。ATP および MTT 測定法はマニュアルに従い、以下のように測定した。ATP 測定法は、96 well-plate に CellTiter-Glo Reagent 100 μ l を加え PerkinElmer Life Sciences (Wellesley, MA, USA) のルミノメーター1420 ARVO MX にセットし、2 分間振とう後、10 分間静置して発光を測定した。MTT 測定法は、96 well-plate に CellTiter-Blue Reagent 20 μ l を加え、10 秒間振とう後、CO₂ インキュベーター内で 90 分間呈色反応を行なった。その後ルミノメーター1420 ARVO MX で 570 nm の蛍光を測定した。

(3) CYP3A4 の代謝的活性化を検出する細胞実験系の構築

CYP の主要な分子種の一つである CYP3A4 で代謝的活性化をうけるトログリタゾンを用いて、実験系の構築ならびに評価を行った。最終濃度が 10,000 cells/well のヒト肝癌由来 HepG2 細胞、124.8 μ g/ml CYP3A4 発現系ミクロソーム (CYP3A4 として 16 nM)、3% FBS を含む DMEM、1 mM NADPH となるように混合した溶液にトログリタゾンを加え、96 well-plate に 100 μ l/well ずつまき、5% CO₂ 存在下 37°C で 24 時間インキュベートし、その後 ATP 測定法および MTT 測定法により細胞生存率を測定した。なお、ジメチルスルフォキシド (DMSO) の最終濃度は 0.1% とした。また対照群にはコントロールミクロソームを CYP3A4 発現系ミクロソームと同じタンパク質濃度で添加した。

(4) ベンゾジアゼピン系薬物の CYP3A4 による代謝的活性化の検討

最終濃度が 10,000 cells/well の HepG2 細胞、62.4 μ g/ml CYP3A4 発現系ミクロソーム (CYP3A4 として 8 nM)、3% FBS を含む DMEM、1 mM NADPH となるように混合した溶液に被験薬を加え、96 well-plate に 100 μ l/well ずつまき、5% CO₂ 存在下 37°C で 24 時間インキ

キュベートし、その後 ATP 測定法および MTT 測定法により細胞生存率を測定した。被験薬としてプロマゼパム、クロルジアゼポキシド、クロバザム、デスメチルジアゼパム、ジアゼパム、フルニトラゼパム、フルラゼパム、ロラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパム、ノルフルジアゼパム、オキサゼパム、テマゼパムを用いた。被験薬の濃度は 50、100、200、400 μM で検討した。なお、DMSO の最終濃度は 0.2% とした。また対照群にはコントロールマイクロソームを CYP3A4 発現系マイクロソームと同じタンパク質濃度で添加した。

(5) ベンゾジアゼピン系薬物のグルタチオン抱合反応

反応系は最終濃度が 100 mM Kpi (pH 7.4)、50 nM CYP3A4 発現系マイクロソーム、10 mM 還元型グルタチオン、100 μM 被験薬となるように混合し全量を 200 μl とした。最終濃度が 1 mM になるように 10 mM NADPH 生成系 (1.94 mM NADP⁺、4.13 mM グルコース 6-リン酸、4.13 mM Kpi (pH 7.4)、0.5 unit/ml グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ) を 50 μl 添加することにより反応を開始した。なお、被験薬は DMSO に溶解し、反応液中の有機溶媒濃度は 1% 以下とした。また対照群にはコントロールマイクロソームを CYP3A4 発現系マイクロソームと同じタンパク質濃度で添加した。37°C で 60 分間インキュベートした後、氷冷したメタノール 750 μl を加え、激しく攪拌することにより反応を停止した。15,000 g で 5 分間遠心分離し、上清 10 μl を 4000 Q TRAP liquid chromatography-tandem mass spectrometry (4000 Q TRAP LC-MS/MS; Applied Biosystems, Lincoln, CA, USA) に注入した。

(6) ベンゾジアゼピン系薬物のグルタチオン抱合体検索

ベンゾジアゼピン系薬物のグルタチオン抱合体の検索には Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) を用いた。装置は 4000 Q TRAP LC-MS/MS を用いた。カラムは Inertsil ODS-3 (100 mm x 2.1 mm ID, 3 μm , GL Science, Tokyo, Japan) を用いた。移動相は 10 mM 酢酸アンモニウム/アセトニトリルを用い、アセトニトリルは試料注入後 0-6 分では 5%、6-11 分では 90%、11-15 分では 5% とした。カラム温度は 40°C、流速は 0.2 ml/min とした。ターボガスは 450°C とし、ネブライジングガス、ターボガスには空気、カーテングスには窒素を用い、それぞれ 60、60、12 psi とした。コリジョンエネルギーは -30 V とした。フルニトラゼパムおよびニメタゼパムの保持時間は約 4 分であった。positive-electrospray ionization (ESI)

mode を用い、precursor ion scan (m/z 272, negative) で分析した。

(7) ベンゾジアゼピン系薬物のグルタチオン抱合体の構造解析

フルニトラゼパムおよびニメタゼパムのグルタチオン抱合体は LCMS-IT-TOF を用い構造解析を行なった。測定条件は (6) の方法に準じた。ただしコリジョンエネルギーは 30 V とした。フルニトラゼパムおよびニメタゼパムの構造解析は ESI mode を用い、それぞれ m/z 621、m/z 601 のイオンを product ion scan (positive) で分析した。

(8) 統計解析

各群における統計学的評価は Student t-test により解析し、P < 0.05 の時、統計学的に有意であると判断した。

4. 研究成果

(1) CYP3A4 の代謝的活性化を検出する細胞実験系の構築

トログリタゾンの細胞障害性が、コントロールマイクロソームと HepG2 細胞を用いた測定系よりも CYP3A4 発現系マイクロソームと HepG2 を用いた測定系で減少した。これは ATP 測定法 (Fig. 1) と MTT 測定法 (Data not shown) とともに同様の結果であった。従って本測定系で CYP による代謝的活性化を検出することが可能と考えられた。

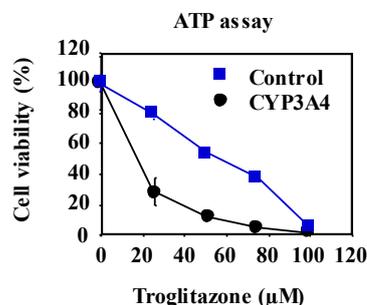


Fig. 1. Effect of troglitazone on cell viability by CYP3A4. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments.

(2) ベンゾジアゼピン系薬物の CYP3A4 による代謝的活性化の検討

13 種のベンゾジアゼピン系薬物に関して、CYP3A4 による薬物の代謝的活性化が及ぼす細胞障害への影響を検討した。フルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムを 100 μM 以上処置した HepG2 細胞において、CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群でコントロールマイクロソーム処置群に比べて細胞生存率は 25% 以上低下した (Fig. 2)。また細胞生存率の低下は薬物の濃度依存的であった。一方、プロマゼパム、クロルジアゼポキシド、クロバザム、デスメチルジアゼパム、ジアゼパム、

フルトラゼパム、ロラゼパム、ノルフルジアゼパム、オキサゼパム、テマゼパムではコントロールマイクロソーム処置群と CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群の間で細胞生存率に顕著な変動は認められなかった。デスメチルジアゼパム、ジアゼパム、フルトラゼパム、ロラゼパム、ノルフルジアゼパム、オキサゼパムではコントロールマイクロソーム処置群において薬物濃度依存的な細胞生存率の低下を示した。

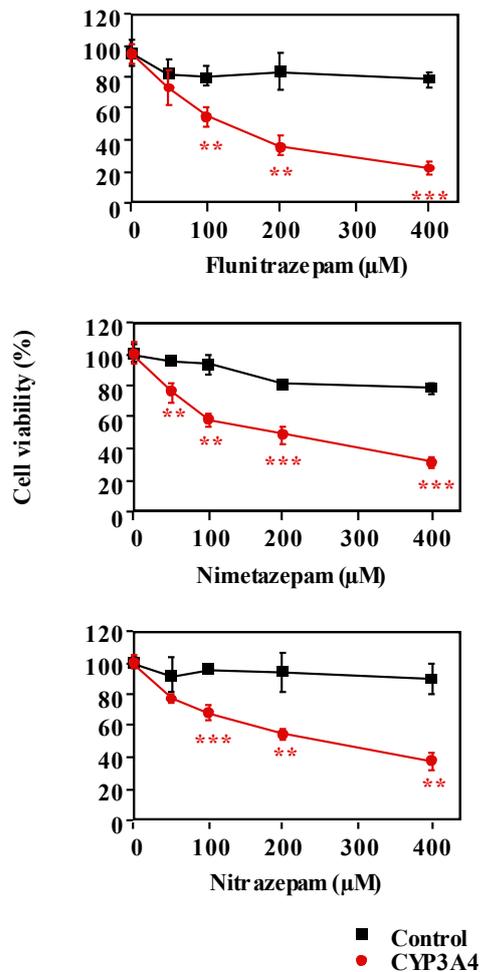


Fig. 2. Changes in the cytotoxicity of benzodiazepine analogues by CYP3A4 on HepG2 cells by ATP assay. The concentrations of drugs were 50, 100, 200 and 400 μM . Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with control.

(3) ベンゾジアゼピン系薬物のグルタチオン抱合体検索

フルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパム、ブロマゼパム、テマゼパムに関して、CYP3A4 の存在下および非存在下でグルタチオン抱合体の生成について LC-MS/MS を用いて検討した。Precursor ion scan (m/z 272, negative) において、CYP3A4 発現系ミクロソーム処置群ではフルニトラゼパムおよびニメタゼパムのグルタチオン抱合体が検出され、それぞれ m/z 619、 m/z 601 であった。一方、コントロールマイクロソーム処置群ではフルニトラゼパムおよびニメタゼパムのグルタチオン抱合体は検出できなかった (data not shown)。またニトラゼパム、ブロマゼパム、テマゼパムでは CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群、コントロールマイクロソーム処置群ともにグルタチオン抱合体は検出できなかった。

ーム処置群ではフルニトラゼパムおよびニメタゼパムのグルタチオン抱合体が検出され、それぞれ m/z 619、 m/z 601 であった。一方、コントロールマイクロソーム処置群ではフルニトラゼパムおよびニメタゼパムのグルタチオン抱合体は検出できなかった (data not shown)。またニトラゼパム、ブロマゼパム、テマゼパムでは CYP3A4 発現系マイクロソーム処置群、コントロールマイクロソーム処置群ともにグルタチオン抱合体は検出できなかった。

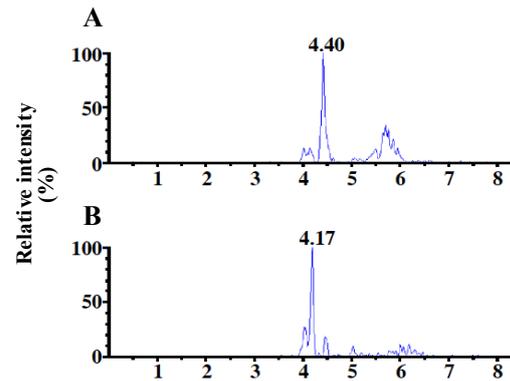


Fig. 3. Extracted ion chromatograms of glutathione conjugates of benzodiazepine analogues. A, flunitrazepam at m/z 619 ($[\text{M}-\text{H}]^-$); B, nimetazepam at m/z 601 ($[\text{M}-\text{H}]^-$).

(4) フルニトラゼパムおよびニメタゼパムのグルタチオン抱合体の構造解析

フルニトラゼパムおよびニメタゼパムのグルタチオン抱合体の構造解析を行なった。フルニトラゼパムのグルタチオン抱合体 (m/z 621) では MS フラグメントとして m/z 492.1、 m/z 348.1、 m/z 284.1 が検出され、 m/z 621 の構造は Fig. 4 と考えられた。一方、ニメタゼパムのグルタチオン抱合体 (m/z 603) では m/z 474.2 および m/z 266.4 の MS フラグメントが検出された。これらはフルニトラゼパムのグルタチオン抱合体である m/z 621 から検出された m/z 492.1 および m/z 284.1 の MS フラグメントとの分子量の差が 18 であり、フルニトラゼパムとニメタゼパムの分子量の差と一致した。しかし m/z 348.1 に対応する MS フラグメントは検出できなかった。

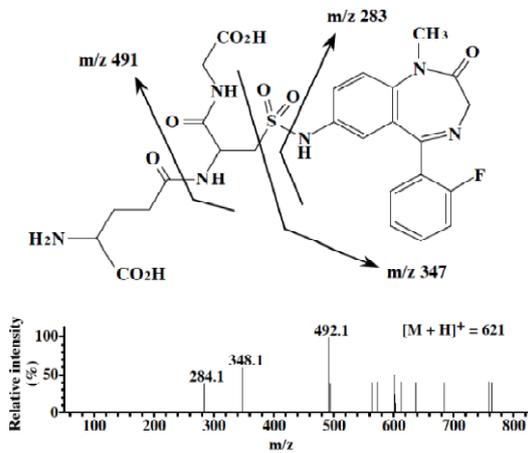


Fig. 4. MS/MS spectrum of glutathione conjugate of flunitrazepam at m/z 621 ($[M + H]^+$).

本申請課題では、CYP による代謝的活性化による肝障害発生の予測系を構築することができた。また、これまでに CYP による代謝的活性化が報告されていないベンゾジアゼピン系薬物について、フルニトラゼパム、ニメタゼパム、ニトラゼパムでは CYP3A4 存在下で細胞障害の増強が認められ、CYP3A4 による代謝的活性化を明らかにした。またフルニトラゼパムおよびニメタゼパムは CYP3A4 とインキュベートすることによりグルタチオン抱合体が検出されたことから、ニトロベンゾジアゼピンのニトロ基が反応性代謝物の生成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究結果は、代謝的活性化の予測にさらに役立つ有益な情報を提供できると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Mizuno K, Katoh M, Okumura H, Nakagawa N, Negishi T, Hashizume T, Nakajima M, Yokoi T. Metabolic activation of benzodiazepines by CYP3A4. Drug Metab Dispos., 37: 345-351 (2009) 査読有

〔学会発表〕(計1件)

水野克彦, 加藤美紀, 中島美紀, 横井毅. ベンゾジアゼピン系薬物の CYP3A4 による代謝的活性化. 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会. 2008.6.27. 国立オリンピック記念青少年総合センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 美紀 (KATOH MIKI)

名城大学・薬学部・准教授

研究者番号：70345594

(2) 研究分担者
(なし)

研究者番号：

(3) 連携研究者
(なし)

研究者番号：