

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07205

研究課題名(和文)フラビン含有酸素添加酵素が既定する化学物質のヒト型モデル動物を用いた体内動態評価

研究課題名(英文) Evaluation for pharmacokinetics of chemicals mediated by flavin-containing monooxygenases using humanized 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) 3,300,000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への酸素添加反応を触媒する。ヒトFMO基質となる医薬品の消失に影響する因子に関する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化学物質の体内動態の評価を行った。ヒト肝移植マウスを用いた結果、生体内におけるFMO基質医薬品と食品由来FMO基質による相互作用の可能性は限定的であることが推察された。FMO3遺伝子変異が既知のカニクイザルを用いた食品由来FMO基質の体内動態はFMO3遺伝子型だけではなく、その量も影響してい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、ヒト型モデル動物を用いて生体内でFMO基質の体内動態に影響する因子を評価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各分子種の情報は少なく、FMOが消失に関与する薬物の体内動態の詳細を明らかにすることは、新たな医薬品開発におけるFMOの代謝を考察する上で意義深いと考える。食品由来成分との相互作用は日常での医薬品の適正使用に対して基盤となる情報として期待できる。

研究成果の概要(英文)：The flavin-containing monooxygenase (FMO) catalyzes the oxygenation of medicines and dietary-derived compounds. However, little information regarding apparent drug interactions has been reported so far for FMO3. Therefore, the purpose of the present study was to investigate the interactions of FMO substrates using humanized-liver mice. In humanized-liver mice, itopride was extensively oxygenated to its N-oxide detected in plasma, whereas control mice were poor metabolizers for itopride. The plasma concentrations of itopride N-oxide after oral administration of itopride with intravenous trimethylamine were significantly suppressed by co-administered trimethylamine only at early phase. Pharmacokinetics modeling suggested that the higher dose of trimethylamine modified the in vivo hepatic intrinsic clearance of itopride. These results suggest that trimethylamine lead to drug interactions for FMO substrate at immediately after administration in vivo, but the potential might be limited.

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フラビン含有酸素添加酵素 (FMO) は薬物代謝の第一相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。ヒト成人肝 FMO 主要分子種である FMO3 は、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、スリンダクやテネリグリブチン、抗悪性腫瘍薬(チロシンキナーゼ阻害薬)ダサチニブなど医薬品の N-および S-酸化反応を触媒する。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)。一方、FMO1 はラットでは、肝臓に発現しており、他の薬物酸化酵素と同様にヒトとの種差が存在している (Yamazaki, Shimizu et al., Biochem Pharmacol, 2013)。

FMO3 の典型的基質であるトリメチルアミンは赤身肉に含まれるコリンおよびカルニチンならびに海産の魚類に含まれるトリメチルアミン N-酸化体が腸内細菌によって分解され生成し、生体内に吸収される。トリメチルアミンはヒト肝 FMO3 によって、トリメチルアミン N-酸化体に代謝され、主に尿中に排泄される。ヒト肝 FMO3 酵素機能の低下はトリメチルアミンがそのまま、汗、呼吸、尿などに排泄されることによってトリメチルアミン尿症 (別名、魚臭症候群) の原因となる。これらの一因として、FMO3 遺伝子の変異が各国で報告されており、筆者らも日本人に特有の FMO3 変異を数多く報告してきた。さらに、ヒト肝 FMO3 は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。一方、欧米人において、トリメチルアミンの代謝物であるトリメチルアミン N-酸化体が動脈硬化症の悪化する可能性が有名誌に報告され、生体への影響が注目されている。これらの影響は通常食飼育下で自発的な動脈硬化病変を呈するアポ E 欠損マウスでも報告された。

医薬品開発において、実験動物を用いた非臨床試験ではヒトの医薬品体内動態を予測するモデル動物の選択が重要となっている。近年、ヒト肝細胞を免疫不全マウスに移植したヒト肝キメラマウスの利用やサル、小型霊長類マーモセットなどの医薬品血中動態からヒトの血中濃度予測を行う手法が開発されつつある。薬物の消失過程に影響を及ぼす薬物代謝酵素としてシトクロム P450 が注目した解析が行われている。ヒト血中薬物動態のシミュレーションを薬物相互作用の予測への利用が行われている。薬物代謝酵素シトクロム P450 の種差は詳細に検討がなされている。しかしながら、フラビン含有酸素添加酵素の種差に関する情報は十分ではない。

2. 研究の目的

本研究では、フラビン含有酸素添加酵素が介する医薬品と化学物質の体内動態をヒト型モデル動物を用いて評価し、酵素基質や阻害薬共存下のヒト体内薬物動態予測へ応用することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト肝移植および非移植マウスにイトブリドおよびトリメチルアミン d9 体を経口および静脈内投与し、基質と酸化的代謝物の血中濃度を測定し、相互に血中濃度への影響を評価した。イトブリドおよびトリメチルアミン d9 体の血中濃度は高速液体クロマトグラフ-質量分析計を用いて測定した。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薬物動態学的パラメータを算出し評価した。さらに FMO3 遺伝子型を確認したカニクイザルにトリメチルアミン d9 体を投与し、血中濃度推移に対する遺伝子型の影響を検討した。

4. 研究成果

ヒト FMO3 は医薬品および食事由来成分の代謝消失に関わっている。我々はリコンビナント FMO3 酵素を用いてトリメチルアミンによる、イトブリド N-酸化酵素活性に対する阻害を検討し、トリメチルアミンが同濃度のイトブリド N-酸化酵素活性を約 60% に阻害したことを報告している。そこで、ヒトおよび動物の生体内薬物酸化における FMO3 を介した相互作用を検討するため、ヒト肝移植および非移植マウスにイトブリドを経口およびトリメチルアミン d9 体を静脈投与し、血中濃度を測定しその影響を検討した。10 mg/kg で投与したイトブリドはヒト肝移植マウスにおいて、速やかに N-酸化体に代謝された。血漿中イトブリド N-酸化体濃度は、トリメチルアミン d9 体 (10 および 100 mg/kg) を同時投与することにより、投与後早期において、投与量依存的に低値を示した。高投与量のトリメチルアミンを併用することにより、イトブリドおよび N-酸化体の血中濃度時間曲線下面積はそれぞれ有意に上昇および減少した。簡易型生理学的薬物動態モデルを用いた体内動態パラメータを算出したところ、生体内の肝固有クリアランス値が抑制されたことによる影響であることが推察された。以上のことから、生体内における食事由来 FMO 基質による相互作用の可能性は限定的であることが推察された。

医薬品開発において、その代謝反応を触媒する酵素の同定は重要である。ヒトの肝ミクロソームを用いて医薬品代謝に関わる酵素を同定する場合、N-酸化反応を触媒する酵素はFMOとP450の関与の可能性が推察される。そこで、医薬品の物性値からFMOが代謝に関与する可能性を推察する *in silico* 推定法を検討した。化合物の窒素含有基の pKa (base)が 8.4 以上を目安とすることで、FMOの酸化的代謝への寄与が予測可能であった。

ヒトFMO3の表現型として、その機能低下に伴いトリメチルアミン尿症を引き起こす。近年、東北メディカル・メガバンク機構により日本人の全ゲノム解析が行われ、その遺伝子情報の活用が注目されている。そこで、表現型解析および遺伝子情報よりFMO3遺伝子変異を探索し、見出した新規変異が酵素機能に及ぼす影響を調べた。対象被験者が約3500人および4700人のデータベース探索から、アミノ酸置換を伴う14種の新規FMO3遺伝子変異を見出した。これらのうち、一部の変異型組換え酵素のトリメチルアミンN-酸化酵素活性は、野生型と比較して著しく低値を示した。これらの新規FMO3遺伝子変異は、既報の同酵素遺伝子変異に加えて、日本人トリメチルアミン尿症の一因となることが推察された。一方、表現型解析からは8種の新規FMO3遺伝子変異を見出した。さらに、トリメチルアミン尿症の症状を示すアルゼンチン人少女の症例をアルゼンチンと日本で相互に共同研究を行った。家系解析から見出した新規FMO3遺伝子変異はp.[P73L;E158K;E308G] および p.F140Sであった。本FMO3遺伝子変異を有する変異型FMO3酵素の試験管内でのトリメチルアミンN-酸化酵素活性は野生型と比較して低値を示した。これらの結果は日本人だけでなく国際的にトリメチルアミン尿症の理解につながると推察された。

非ヒト霊長類カニクイザルはヒトのモデル動物として頻用されている。我々は非ヒト霊長類カニクイザルFMO3遺伝子多型を調べ、*in vitro* 酵素活性に一部変動をもたらす18種類の変異を報告した。本研究では、FMO3遺伝子型既知のカニクイザルを用いて安定同位体標識したトリメチルアミンの体内動態を明らかにした。FMO3遺伝子変異を有したカニクイザル3頭のトリメチルアミン体内動態に、調べた範囲において大きな個体差は認められなかった。生体内におけるトリメチルアミンの消失にはFMO3遺伝子型、すなわち質だけではなく、その量も影響していることが推察された。本研究の結果は、サルだけでなく、FMO3遺伝子変異を有するヒトにおけるFMO3基質の体内動態予測の基盤情報となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimizu Makiko, Uehara Shotaro, Suemizu Hiroshi, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 37
2. 論文標題 In?vivo drug interactions of itopride and trimethylamine mediated by flavin-containing monooxygenase 3 in humanized-liver mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100369 ~ 100369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2020.11.004	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 Taniguchi-Takizawa Tomomi, Kato Harutoshi, Shimizu Makiko, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Predicted Contributions of Flavin-containing Monooxygenases to the N-oxygenation of Drug Candidates Based on their Estimated Base Dissociation Constants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Drug Metabolism	6. 最初と最後の頁 208 ~ 214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1389200221666201207195758	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 Makiko, Koibuchi Natsumi, Mizugaki Ami, Hishinuma Eiji, Saito Sakae, Hiratsuka Masahiro, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 38
2. 論文標題 Genetic variants of flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) in Japanese subjects identified by phenotyping for trimethylaminuria and found in a database of genome resources	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100387 ~ 100387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2021.100387	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 Taniguchi-Takizawa Tomomi, Kato Nozomu, Shimizu Makiko, Kume Toshiyuki, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 40
2. 論文標題 Different substrate elimination rates of model drugs pH-dependently mediated by flavin-containing monooxygenases and cytochromes P450 in human liver microsomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100412 ~ 100412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2021.100412	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 Makiko, Mizugaki Ami, Koibuchi Natsumi, Sango Haruna, Uenuma Yumi, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 41
2. 論文標題 A series of simple detection systems for genetic variants of flavin-containing monooxygenase 3 (FM03) with impaired function in Japanese subjects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 100420 ~ 100420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2021.100420	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 Dionisio Leonardo, Shimizu Makiko, Stupniki Sofia, Oyama Saki, Aztiria Eugenio, Alda Maximiliano, Yamazaki Hiroshi, Spitzmaul Guillermo	4. 巻 35
2. 論文標題 Novel variants in outer protein surface of flavin-containing monooxygenase 3 found in an Argentinian case with impaired capacity for trimethylamine N-oxygenation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 383 ~ 388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2020.05.003	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 Shimizu Makiko, Uno Yasuhiro, Utoh Masahiro, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 35
2. 論文標題 Trimethylamine N-oxygenation in cynomolgus macaques genotyped for flavin-containing monooxygenase 3 (FM03)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 571 ~ 573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2020.07.001	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 Uraoka Mirai, Shimizu Makiko, Kuwajima Yoshiki, Mizugaki Ami, Yokoyama Haruka, Mure Kanae, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Different Effects of Polymorphic Flavin-Containing Monooxygenase 3 and Cytochrome P450 2A6 Activities on an Index of Arteriosclerosis as a Lifestyle-Related Disease in a General Population in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Drug Metabolism	6. 最初と最後の頁 1161 ~ 1164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1389200221666201009140802	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 Makiko, Yoda Hiromi, Nakakuki Komei, Saso Aoi, Saito Iria, Hishinuma Eiji, Saito Sakae, Hiratsuka Masahiro, Yamazaki Hiroshi	4. 巻 34
2. 論文標題 Genetic variants of flavin-containing monooxygenase 3 (FM03) derived from Japanese subjects with the trimethylaminuria phenotype and whole-genome sequence data from a large Japanese database	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 334 ~ 339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dmpk.2019.06.001	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8件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宇野泰広、清水万紀子、小川友里衣、藤井優哉、山崎浩史
2. 発表標題 ネコ、イヌ、ブタにおけるフラビン含有モノオキシゲナーゼの同定・解析
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口友美、加藤望、加藤晴敏、久米俊行、清水万紀子、山崎浩史
2. 発表標題 創薬候補品のpH依存的N-酸化反応に対するフラビン含有酸素添加酵素の寄与予測
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水万紀子、巻口美晶、中村友里愛、菱沼英史、齋藤さかえ、平塚真弘、山崎浩史
2. 発表標題 東北メディカル・メガバンク統合データベースより見出した新規フラビン含有モノオキシゲナーゼ3 遺伝子変異の酵素機能に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中敏博, 清水万紀子, 山崎浩史
2. 発表標題 アルブラゾラムとロキソプロフェンの誤飲が疑われた1歳児における薬物動態分析
3. 学会等名 第41回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水万紀子, 山崎浩史
2. 発表標題 フラビン含有酸素添加酵素が関わる薬物体内動態の個人差と相互作用
3. 学会等名 日本薬学会第141年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Makiko Shimizu, Shotaro Uehara, Hiroshi Suemizu, Hiroshi Yamazaki
2. 発表標題 Drug interactions mediated by flavin-containing monooxygenase in humanized-liver mice
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 浩史、北島 正人、清水 万紀子
2. 発表標題 肝毒性予測のため薬物動態モデル
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水万紀子、水垣亜美、浦岡未来、桑島愛生、牟礼佳苗、山崎浩史
2. 発表標題 日常生活下日本人の動脈硬化症指標とチトクロム P450 2A6 遺伝子型の関連
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	山崎 浩史 (Yamazaki Hiroshi) (30191274)	昭和薬科大学・薬学部・教授 (32624)	
研究分担者	村山 典恵 (Murayama Norie) (90219949)	昭和薬科大学・薬学部・講師 (32624)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
アルゼンチン	Universidad Nacional Del Sur	Instituto de Diagnostico Infantil	