

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590177

研究課題名（和文）薬物相互作用に係わる酵素活性の協同性の解析：サリドマイドが及ぼす薬効の消失・亢進

研究課題名（英文） Drug interaction of thalidomide with midazolam and other compounds : heterotropic cooperativity of human cytochrome P450

研究代表者 村山 典恵 (MURAYAMA NORIE)

昭和薬大・薬学部・講師

研究者番号：90219949

研究成果の概要(和文):サリドマイド近年多発性骨髄腫の治療目的で再度承認された薬剤である。しかし作用機序および特に肝代謝酵素への影響について不明なところも多いことから、サリドマイドの肝薬物代謝酵素への協同的な活性変動機構について解析した。サリドマイドの生体内運命として肝薬物代謝酵素チトクロム P450(CYP)によって速やかに代謝され、グルタチオン抱合によって排泄されることが明らかとなった。また、*in vitro* の実験からは、サリドマイドは CYP3A に協同性を示し、特に日本人で発現率の高い CYP3A5 に関してその影響が顕著であることを初めて見出した。また、細胞系による実験からも、サリドマイドの協同性の影響が明らかとなったことから、サリドマイドは肝臓に直接作用して、肝薬物代謝酵素との協同性を示すと示唆された。

研究成果の概要(英文): There is growing clinical interest of thalidomide because of its immunomodulatory and antiangiogenic properties, despite its teratogenicity. However, little information about thalidomide has been reported regarding its precise effects on drug-metabolizing enzymes. We investigated the effects of thalidomide on cytochrome P450 (P450) enzymes in human liver microsomes to clarify the potential for possible drug interactions. The present results suggest that total midazolam metabolism or cyclosporine A clearance may be increased by thalidomide in a dose-dependent manner. Unexpected drug interactions involving thalidomide might occur via heterotropic cooperativity of polymorphic P450 3A5. We investigate these drug interactions in cultured human liver cell line system more closely resembled livers. A new hepatic cell line system with differentiated HepaRG cryopreserved (Biopredic International, Rennes, France) was adopted. These results suggest that cultured human cell line system with differentiated HepaRG cryopreserved could be applicable to thalidomide drug interaction study. Further oxidative metabolism of 5-hydroxythalidomide to 5-hydroxythalidomide GSH-conjugate formation is under investigation using the new HepaRG cell system mimicking *in vivo* human livers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000

2011 年度	700,000	210,000	910,000
総 計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：薬物動態学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物相互作用、サリドマイド、協同性、ヒト型モデルマウス、P450、HepaRG

1. 研究開始当初の背景

サリドマイドは、催奇形性の面から一度は市場から撤退した薬剤でありながら、近年多発性骨髄腫に対する有効性が認められ、希少疾患用医薬品として許可された。しかし、サリドマイドの作用機序及び特に、肝薬物代謝酵素への影響について不明な点が多かった。

2. 研究の目的

サリドマイドの肝薬物代謝酵素活性への協同的な活性変動機構について解明し、薬物の有害作用を予測することにより臨床での安全な薬物治療に役立てる。さらに、これまで問題にされていなかったサリドマイドの直接的・間接的な作用による肝薬物代謝酵素の修飾について、ヒト肝に置換されたヒト型キメラマウスを用いた *in vivo* での影響について検討を行った。

3. 研究の方法

1) 臨床上的サリドマイドと他の薬剤間で考えられる協同性の影響について； 临床上サリドマイドと併用される可能性のある薬剤の代謝への影響について、*in vitro* の結果を基に *Pharmacokinetics* 解析を行い、影響の程度を推定できる定数を提案する。さらに化学物質の毒性評価のために研究室で開発・構築した簡便な *PBPK* モデルを用いた *in silico* での解析法を医薬品へも応用していくことにより、対象薬物の血中濃度推移を算出し *P450* 代謝活性への影響との関連性を総合的に判断し、結果の予測をより正確にするための定数を算出する。今回新たに開発された人型肝モデルキメラマウスを用いて、サリドマイド投与後の経時的な血中濃度ならびに代謝物に関して *LC/MS/MS* による測定を行うことで、得られた実測値を基に本研究室で開発・構築している *PBPK* モデルを用いたシミュレーションを行うことで、毒性の影響を推測する。

2) サリドマイドによる肝直接的な影響； ヒト肝癌由来 *HepG2* 細胞および *LXR* 発現細胞にサリドマイド代謝に関与するヒト *P450* 分子種発現プラスミドをリポフェクション法を用いて導入、タンパクを発現させる。培地にサリドマイドを添加し、一定時間培養後各 *P450* の指標活性を測定し、遺伝子導入を行っていない対照細胞と比較する。また、肝

臓の機能解析に関しての有効性が期待されている *HepaRG* 細胞を用いて、よりヒト初代培養系に近い条件で実験を行うことで *morphological* な変化と肝機能の実質的な変化の両面からサリドマイドの治療期間の間に起こりうる肝臓への影響を総合的に解析する。肝臓への影響が細胞障害性によるものかどうかに関しては細胞傷害性を測定する *Multiplex Cytotoxicity Assay* を行なう。さらに、細胞増殖に関して認められる抑制効果の機構のうちで転写活性化への影響については、細胞の核抽出液を用いた、ゲルシフトアッセイならびに、*mRNA* レベルの変動に関して、リアルタイム *PCR* 法で測定する。

3) サリドマイド代謝に認められる種差の検討； 創薬においてサルはヒトに進化の過程においてもヒトに近いことから実験動物として汎用されているが、昨年欧米では動物愛護のために使用が制限された。最近遺伝的に矮小であるマイクロミニブタがサルに変わる実験動物として注目されつつあるが、薬物動態に関する詳細な検討が成されていない。今回このマイクロミニブタの肝薬物代謝酵素活性の特徴についてヒトとの比較検討を行う。さらに、実際にマイクロミニブタを用いたサリドマイド投与による毒性ならびに肝臓の代謝酵素活性への影響に関して、*in vivo* でも検討を行う。

4. 研究成果

サリドマイドの生体内動態に関して、これまで詳細な検討がなされていなかったことから、新たに開発されたヒト型モデルキメラマウスを用いて、サリドマイド投与後の経時的な血中濃度推移と大差産物精製に関して、検討を行なった結果、ヒト肝移植キメラマウスからは、5 位水酸化サリドマイドの生成が認められ、さらにこの水酸化体はグルタチオンによる抱合反応を受けることが明らかとなった。このことから、ヒト肝ではサリドマイドは速やかに代謝消失し生体外へ排泄されることが明らかとなった。また、*in vitro* 実験系の結果からサリドマイドは肝薬物代謝酵素の中の *CYP3A5* に対して協同性を示し、特に日本人では発現頻度が高いことから、薬物の服用に際して十分配慮する必要があることを始めて提唱するに至った。

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 11 件)

- ① Chowdhury, G. ., Murayama, N., Okada, Y., Uno, Y., Shimizu, M., Shibata, N., Guengerich, F. P., and Yamazaki, H. Human liver microsomal cytochrome P450 3A enzymes involved in thalidomide 5-hydroxylation and formation of a glutathione conjugate. *Chem.Res.Toxicol.*, 査読有,23, 1018-1024,2010
DOI: 10.1021/tx900367
- ② Takano R, Murayama N, Horiuchi K, Kitajima M, Kumamoto M, Shono F, Yamazaki H. Blood concentrations of acrylonitrile in humans after oral administration extrapolated from in vivo rat pharmacokinetics, in vitro human metabolism, and physiologically based pharmacokinetic modeling. *Regul Toxicol Pharmacol.* 査読有 58、252-8. 2010 PMID:20600458
- ③ Shimada, T., Tanaka, K., Takenaka, T., Murayama, N., Martin, M. V., Foroozesh, M. K. Yamazaki, H., Guengerich, F. P., and Komori. M. Structure-function relationships of inhibition of human cytochromes P450 1A1, 1A2, 1B1, 2C9, and 3A4 by 33 flavonoid derivatives. *Chem.Res.Toxicol.*, 査読有 ,23, 1921-1935, 2010 **DOI:** 10.1021/tx100286d
- ④ Nakamura, K., Mizutani, R., Sanbe, A., Enosawa, S., Kasahara, M., Nakagawa, A., Ejiri, Y., Murayama, N., Miyamoto, Y., Torii, T., Kusakawa, S., Yamauchi, J., Fukuda, M., Yamazaki, H., and Tanoue. A., Evaluation of drug toxicity with hepatocytes cultured in a micro-space cell culture system . *J.Biosci.Bioeng.*, 査読有,111, 78-84, 2011 PMID:20837398
- ⑤ .Akiyoshi, T. Saito, T., Murase, S., Miyazaki, M. Murayama, N., Yamazaki, H., Guengerich, F.P., Nakamura, K., Yamamoto, K., and Ohtani, H. Comparison of the inhibitory profiles of itraconazole and cimetidine in cytochrome P450 3A4 genetic variants. *Drug Metab.Dispos.* 査読有 ,39, 724-728, 2011 doi: 10.1124/dmd.110.036780
- ⑥ Emoto, C., Iwasaki, K., Koizumi, R., Utoh, M., Murayama, N., Uno Y., and Yamazaki, H. Species difference between cynomolgus monkeys and

humans on cytochromes P450 2D and 3A-dependent drug oxidation activities in liver microsomes. *J.Health Sci.*, 査読有.57, 164-170, 2011 <http://dx.doi.org/10.1248/jhs.57.164>

- ⑦.Sugiyama, M., Fujita, K., Murayama, N., Akiyama, Y., Yamazaki, H., and Sasaki, Y.. Sorafenib and sunitinib, two anti-cancer drugs, inhibit CYP3A4- and activate CYP3A5-mediated midazolam 1' hydroxylation. *Drug Metab.Dispos.*, 査読有 ,39, 757-762, 2011,10.1124/dmd.110.037853
 - ⑧ .Niwa, T., Murayama, N., Umeyama, H., Shimizu, M., and Yamazaki, H. Human liver enzymes responsible for metabolic elimination of tyramine, a vasopressor agent from daily food. *Drug Metab.Lett.*, 査読有,5, 216-219, 2011 PMID:21679153
 - ⑨ Kansaku F, Kumai T, Sasaki K, Yokozuka M, Shimizu M, Tateda T, Murayama N, Kobayashi S, Yamazaki H Individual differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anesthetic agent propofol with regard to CYP2B6 and UGT1A9 genotype and patient age. *Drug Metab Pharmacokinet.* 査読有 ,26:532-7. 2011<http://dx.doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-039>
 - ⑩ .Niwa T, Murayama N, Yamazaki H. Stereoselectivity of human cytochrome p450 in metabolic and inhibitory activities. *Curr Drug Metab.* 査読有 ,12,549-69. 2011 PMID:21476971
 - ⑪ .Niwa T, Murayama N, Yamazaki H. Comparison of cytochrome P450 2D6 and variants in terms of drug oxidation rates and substrate inhibition. *Curr Drug Metab.* 査読有,12,412-35, 2011 PMID:21453270
- [学会発表] (計 6 件)
- ① Toshihiko Ikeda, Norie Murayama and Hiroshi Yamazaki An improved method to assess internal radiation exposure in humans using in vivo and in vitro animal pharmacokinetic data, 25th JSSX Annual Meeting(埼玉) 平成 22 年 10 月 8 日
 - ② Hiroshi Yamazaki, Toshio Kumai, Kuniharu Sasaki, Makito Yokozuka, Makiko Shimizu, Tadashi Tateda, Norie Murayama and Shinichi Kobayashi: Individual differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anesthetic agent

propofol in patients genotyped for CYP2B6 and UGT1A9

ISSX Workshop on Genetic Polymorphisms in Drug Disposition (Indianapolis, USA)
平成 22 年 4 月 11 日

- ③ 村山典恵、國兼絵里子、塚田 藍、高野良治、北島正人、清水万紀子、池田敏彦、山崎浩史：肝試料画分を考慮した化学物質のヒト生理学的薬物動態モデルの精緻化 日本薬学会第 131 回年会(静岡)平成 23 年 3 月 29 日
- ④ Norie Murayama, Kanako Yajima, Makiko Shimizu, Masahiro Utoh, and Hiroshi Yamazaki: Drug interactions of thalidomide with midazolam in human hepatoma cell line system with differentiated HepaRG cryopreserved 17 th North American regional ISSX meeting (Atlanta, USA)平成 23 年 10 月 18 日
- ⑤ Norie Murayama, Kanako Yajima, Makiko Shimizu, Masahiro Utoh, and Hiroshi Yamazaki: Drug metabolism in human hepatomacell line system with differentiated HepaRG cryopreserved 26th JSSX Annual Meeting (広島) 平成 23 年 11 月 17 日
- ⑥ 村山典恵、山下真直、塚田 藍、末水洋志、中村雅登、高野良治、清水万紀子、山崎浩史：チオカルバメート系除草剤モリネートの代謝消失における種差の検討 日本薬学会第 132 回年会(札幌)平成 24 年 3 月 29 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.shoyaku.ac.jp/labosite/doutai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村山 典恵 (MURAYAMA NORIE)

昭和薬大・薬学部・講師

研究者番号：90219949

(2) 研究分担者

山崎 浩史 (YAMAZAKI HIROSHI)

昭和薬大・薬学部・教授

研究者番号：30191274

清水 万紀子 (SHIMIZU MAKIKO)

昭和薬大・薬学部・助教

研究者番号：90307075