

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590200

研究課題名(和文) サリドマイド等の医療用医薬品から生成するヒト反応性代謝物の検出と評価

研究課題名(英文) Thalidomide increases cytochrome P450 activity and drug metabolism in liver through direct activation of nuclear receptor CAR and PXR

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) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肝細胞移植キメラマウスに医薬品サリドマイドを同時あるいは前投与すると、併用したヒトP450 3A指標医薬品の消失が亢進した。ヒト肝培養細胞系の同酸化酵素活性およびP450 3A mRNA量はサリドマイドにより上昇した。核内調節因子を調べるマイクロアレイ試験法では、サリドマイドは核内受容体PXRのリガンドとなった。サリドマイドの芳香環水酸化に伴い、還元型グルタチオンと結合しうるヒト型反応性代謝物が生成すること、酵素誘導や酵素活性促進を含めた薬物相互作用惹起の可能性が示唆された。以上、サリドマイドは核内レセプターを介してヒト肝薬物代謝酵素の誘導効果を有し、自身を反応性代謝物へ導くと結論づけた。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated heterotropic cooperativity of human cytochrome P450 (P450) 3A4/5 by the teratogen thalidomide using a model substrate midazolam in various in vitro and in vivo models. Chimeric mice with humanized liver displayed enhanced midazolam clearance upon pre-treatment with orally administered thalidomide, presumably because of human P450 3A induction. Thalidomide enhanced levels of P450 3A4/2B6 mRNA, protein expression, and/or oxidation activity in human hepatocytes indirectly suggesting activation of gene transcription factors. Thalidomide and its human proportionate metabolite 5-hydroxythalidomide displayed significant modulation of coregulator interaction with CAR and PXR ligand-binding domains similar to established agonists for these receptors. These results collectively suggest that thalidomide could act as a ligand for PXR and CAR and cause enzyme induction. The possibilities of drug interactions during thalidomide therapy in humans should be evaluated further.

研究分野：医療系薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物代謝

### 1. 研究開始当初の背景

医師の監督下に使用する医療用医薬品が惹起する個々の患者の副作用には、予測かつ修復が可能なものもあるが、一方で特異体質とされるもの、用量や使用期間に依存する予測の難しい有害作用がある。後者の毒性については、生体内における医薬品の代謝物とその有害作用の原因となっていることが多い。米国食品医薬品局 (FDA) は、医薬品代謝物の安全性試験に関する産業界向けガイダンスを 2008 年に発表した。このような背景から、ヒトに選択的あるいは特異的な反応性代謝物の同定とその生成機構に関する研究が世界の医薬あるいは化学の分野で精力的に展開されている。

本研究課題の中心となるサリドマイドは、約半世紀前に催奇形性の問題から市場より撤退したが、多発性骨髄腫の治療薬としてアメリカや日本等、世界的に医療用医薬品として各国政府機関によって承認された。この薬物が惹起する重篤な毒性には従来から大きな動物種差が指摘されているが、その詳細は不明である。

### 2. 研究の目的

研究代表者らは、サリドマイドがヒト薬物代謝酵素チトクロム P450 (P450) の酵素機能を修飾することを明かにした。さらに本薬は酸化反応を受けヒト反応性代謝物を生成することをグルタチオン付加体として捕捉し、試験管内で証明した。しかしながら、*in vitro* 試験には実験上の制約から、ある種の限界も指摘されはじめており、創薬や医薬品適正使用についての研究が必要とされている。

このような背景から、学外研究協力者の支援を得て、ヒト肝を移植したマウスと、光学活性体であるサリドマイドおよびその一次代謝物を用い、試験管内で検出したサリドマイド反応性代謝物が動物体内における影響を、最先端のヒト肝移植モデルを使って毒性的に明かにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

実験動物中央研究所にて開発されたヒト肝細胞移植キメラマウスを動物モデルとして採択した。ヒト肝保有マウスとヒト肝非保有マウスにそれぞれ被験物質を経口投与した際の血中濃度推移を調べた。さらに近年フランス国立衛生研究所で開発された HepaRG 細胞は、株化細胞でありながら第一相および第二相薬物代謝酵素活性を有している。このヒト肝に近似できる培養細胞系を活用し、反応性代謝物を補足した場合のヒト特有な毒性発現を詳細に解析した。

実験エンドポイントは、培養細胞系およびキメラマウスにおけるグルタチオン等生体内 SH 化合物との抱合体の高速液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC-MS/MS) 解析とマイクロアレイ解析とした。培養細胞を用いる研究では、HepaRG 細胞をプレートに蒔き、サ

リドマイド添加で 72 時間培養後、プロピオンおよびミダゾラム代謝活性を測定した。リアルタイム PCR により、活性測定を行った HepaRG 細胞の P450 3A4 および P450 2B6 mRNA 量を測定した。Microarray assay for real-time analysis of coregulator-nuclear receptor interaction (MARCoNI) 法により、サリドマイド、5-水酸化サリドマイド、デキサメサゾンおよびリファンピシンについて 154 種の coregulator motif との反応性を Modulation Index (MI) を用いて比較検討した。

### 4. 研究成果

ヒトにおける医薬品あるいは候補品の代謝物の安全性評価に関して、ヒト肝を酵素源とする *in vitro* 研究および肝を移植したヒト型モデルマウスを用いた *in vivo* 研究を組み合わせて検討した。医療用医薬品の例として、サリドマイドとその一次代謝物を、ヒト肝保有マウスに経口投与し、酸化的代謝によって生じた反応性代謝物をグルタチオン付加体として定量的に検出した。基礎的データとして、ヒト肝細胞をマウス体内で増殖させたのち、酵素源として試験管内におけるサリドマイドの酸化的代謝速度、反応性代謝物とその標的タンパク質について詳細に評価した。

生体内でのサリドマイドの挙動に関する情報を得るため、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た。サリドマイドの芳香環水酸化に伴い、還元型グルタチオンと結合しうるヒト型反応性代謝物生成研究から、P450 3A4/5 による肝代謝型クリアランス、酵素誘導や酵素活性促進を含めた薬物相互作用惹起の可能性が示唆された。

ヒト肝由来培養細胞を用いた検討からミダゾラム 4-及び 1'-水酸化酵素活性はサリドマイド添加により、いずれも 2 倍程度の上昇が認められた。一方、サリドマイド 5-水酸化体添加では、著しい変動は認められなかった。特に P450 3A mRNA に関してはおよそ 4.5 倍の増加が認められた。MARCoNI 法ではサリドマイドはデキサメサゾンやリファンピシンと同様に PXR および CAR のリガンドとして作用することが明らかとなった。以上の結果から、サリドマイドは核内レセプターを介してヒト肝薬物代謝酵素の誘導効果を有する可能性が強く示唆された。

動物とヒトとに種差の認められる P450 酸化反応の差異からヒトに特有な医薬品活性代謝物が生成し、多様なヒト肝タンパクと共有結合する可能性を示す事例に本研究で取り上げたサリドマイドがある。医薬品由来の反応性代謝物は標的受容体またはその他の標的 (酵素、タンパク質など) と相互作用して、意図しない作用を示すことがある。これらのことから、実験動物では安全性が高いと

判断された医薬候補品のヒトにおける毒性予測の観点から薬物代謝試験を統合した医薬品の安全性研究の体系化に期待が寄せられる。

#### 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 81 件)

Murayama, N., van Beuningen, R., Suemizu, H., Guguen-Guillouzo, C., Shibata, N., Yajima, K., Utoh, M., Shimizu, M., Chesne, C., Nakamura, M., Guengerich, F. P., Houtman, R., and Yamazaki, H. Thalidomide increases human hepatic cytochrome P450 3A enzymes by direct activation of pregnane X receptor., *Chem.Res.Toxicol.*, 査読有, 27, 304-307, 2014. doi: 10.1021/tx4004374

Chowdhury G, Shibata N, Yamazaki H and Guengerich FP. Human cytochrome P450 oxidation of 5-hydroxythalidomide and pomalidomide, an amino analog of thalidomide. *Chem. Res.Toxicol.*, 査読有, 27, 147-156, 2014.

doi: 10.1021/tx4004215

Yamazaki, H., Suemizu, H., Murayama, N., Utoh, M., Shibata, N., Nakamura, M., and Guengerich, F. P. In vivo drug interactions of the teratogen thalidomide with midazolam: Heterotropic cooperativity of human cytochrome P450 in humanized TK-NOG mice. *Chem.Res.Toxicol.*, 査読有, 26, 486-489, 2013.

doi 10.1021/tx400008g

Tsukada, A., Suemizu, H., Murayama, N., Takano, R., Shimizu, M., Nakamura, M., and Yamazaki, H. Plasma concentrations of melengestrol acetate in humans extrapolated from

the pharmacokinetics established in in vivo experiments with rats and chimeric mice with humanized liver and physiologically based pharmacokinetic modeling.

*Regul.Toxicol.Pharmacol.*, 査読有, 65, 316-324, 2013.

doi: 10.1016/j.yrtph.2013.01.008

Nakamura, K., Matsuzawa, N., Ohmori, S., Ando, Y., Yamazaki, H., and Matsunaga, T. Clinical evidence of the pharmacokinetics change in thalidomide therapy. *Drug Metab.Pharmacokinet.*, 査読有, 28, 38-43, 2013.

doi: 10.2133/dmpk.DMPK-12-RV-089

Yamazaki, H., Suemizu, H., Shimizu, M., Igaya, S., Shibata, N., Nakamura, N., Chowdhury, G., and Guengerich, F.P. In vivo formation of dihydroxylated and glutathione conjugate metabolites derived from thalidomide and 5-hydroxythalidomide in humanized TK-NOG mice. *Chem Res Toxicol*, 査読有, 25, 274-276, 2012.

doi: 10.1021/tx300009j

Kuribayashi, S., Uno, Y., Naito, S., and Yamazaki, H. Different metabolites of human hepatotoxic pyrazolopyrimidine derivative 5-*n*-butyl-pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidine produced by human, rat, and monkey cytochrome P450 1A2 and liver microsomes. *Basic*

*Clin.Pharmacol.Toxicol.*, 査読有, 110, 405-408, 2012.

doi:

10.1111/j.1742-7843.2011.00823.x

Yamazaki, H., Suemizu, H., Igaya, S., Shimizu, M., Shibata, N., Nakamura, M.,

Chowdhury, G. and Guengerich, F. P. *In vivo* formation of a glutathione conjugate derived from thalidomide in humanized uPA-NOG mice.

*Chem. Res. Toxicol.*, 査読有, 24, 287-289, 2011.

doi: 10.1021/tx200005g

〔その他〕

ホームページ等

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

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

## 6. 研究組織

### (1) 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：3 0 1 9 1 2 7 4

### (2) 研究分担者

清水 万紀子 (SHIMIZU, Makiko)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：9 0 3 0 7 0 7 5

村山 典恵 (MURAYAMA, Norie)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：9 0 2 1 9 9 4 9