

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460198

研究課題名(和文)フラビン含有酸素添加酵素が関与する薬物酸化および相互作用の評価基盤

研究課題名(英文) Drug oxygenations and interactions mediated by polymorphic flavin-containing monooxygenases

研究代表者

清水 万紀子 (SHIMIZU, Makiko)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90307075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：薬物酸化酵素フラビン含有酸素添加酵素3 (FMO3) は化学物質、食品由来成分および医薬品のN-およびS-酸化反応を触媒する酵素である。近年、FMO3が代謝消失にかかわる医薬品が報告あるいは上市されている。しかし、FMO3が関与する併用薬による薬物相互作用の詳細は明らかではない。本研究ではリコンビナント酵素、肝ミクロソームを用いて薬物相互作用の可能性を検討した。日本人で高頻度に認められるFMO3遺伝子多型が本酵素の関わる医薬品代謝消失および薬物相互作用の個人差の原因となる可能性が推察された。

研究成果の概要(英文)：The flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) catalyzes the oxygenation of N- and S- containing medicines and xenobiotic substances. From viewpoint of growing interest in drug interactions mediated by polymorphic FMO3, benzydamine N-oxygenation and sulindac sulfide S-oxygenation by human liver microsomal FMO3 were investigated as model reactions. Genetic polymorphisms in the human FMO3 gene might lead to some changes of enzyme activities and drug-drug interactions for N- or S-oxygenations of endogenous and xenobiotic substances including medicines. Since even the most common p. [(Glu158Lys; Glu308Gly)] variant FMO3 protein could result in stronger inhibition potential, genetic polymorphism of human FMO3 gene might lead to unexpected drug interactions via modulation of FMO3 catalytic efficiency.

研究分野：薬物代謝

キーワード：フラビン含有酸素添加酵素3 FMO3 薬物代謝酵素 相互作用

### 1. 研究開始当初の背景

薬物代謝酵素フラビン含有酸素添加酵素 (FMO) は生体異物の第一相代謝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 の主要分子種は FMO3 である。FMO3 はヒト肝において発現量が多い酵素であり、ニコチン、食品由来トリメチルアミン等の幅広い化学物質、臨床に用いられているオランザピン、ラニチジンなどの含窒素医薬品、シメチジン、スリダグなどの含硫黄医薬品の *N*-および *S*-酸化反応を触媒する。近年、欧米において臨床試験中の抗がん薬トザセルチブおよび国内において 2012 年 6 月に承認 (9 月発売) された糖尿病薬 (DPP-4 阻害薬) テネリグリプチンが主に FMO3 で代謝されることが報告されている。FMO3 は従来酵素誘導されにくいと考えられてきた一方で、ヒト肝の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。研究代表者らは FMO3 酵素機能低下が原因となる疾患であるトリメチルアミン尿症に関して、日本人の自己申告トリメチルアミン尿症被験者の FMO3 遺伝子のコーディング領域の解析を行い、日本人の新規遺伝子変異を 12 種見出し、その組換え酵素の触媒活性、成長に伴う FMO3 表現型の個人差、ならびに FMO3 遺伝子 5' -上流領域のハプロタイプ解析および転写活性を報告してきた。

### 2. 研究の目的

薬物酸化酵素フラビン含有酸素添加酵素 3 (FMO3) は第一相薬物代謝反応において、化学物質、食品由来成分および幅広い医薬品の *N*-および *S*-酸化反応を触媒する重要な酵素である。近年、FMO3 が代謝消失にかかわる医薬品が報告あるいは上市されている。しかし、FMO3 が関与する併用薬による薬物相互作用の詳細は明らかではない。FMO3 に焦点を当てて薬物相互作用を予測することは、FMO3 が責任酵素となる医薬品の開発や医薬品を用いた個別化治療を行う上での基盤情報として有用である。そこで本研究では、ヒト肝 FMO3 を介する薬物相互作用の詳細を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

ヒト FMO3 の基質となりうる化学物質を検索した。リコンビナントヒト FMO3 酵素を調製し、FMO3 の典型的基質であるベンジダミンの *N*-酸化酵素活性に対し FMO3 基質の候補医薬品および化学物質を共存させ、阻害の程度を測定した。阻害が認められた医薬品または化学物質を基質または阻害剤として用い、各種医薬品の酸化酵素活性に対する共存化合物の抑制作用を相互に評価した。

欧米および日本人で共通に見出される変異である p. [(Glu158Lys;Glu308Gly)] および p. (Val257Met) 変異ならびに日本人で見出された変異である p. (Arg205Cys) 変異のリコン

ピナントヒト FMO3 酵素を用いて、各種医薬品の酸化酵素活性に対する共存化合物の抑制作用を相互に評価した。リコンビナントヒト FMO3 酵素ならびにヒトプールド肝マイクロゾームおよび FMO3 遺伝子変異をあらかじめ判定したヒト個別肝マイクロゾームを用いて併用薬物の酵素活性阻害定数  $K_i$  値の算出を行った。米国 FDA 相互作用ドラフトガイダンスで用いられている  $1+[I]/K_i$  を用いて AUC 上昇率を算出した。

### 4. 研究成果

リコンビナント酵素を用いて、FMO3 の典型的な指標反応であるベンジダミン *N*-酸化酵素活性に対して共存化合物の抑制効果を検討した。41 種類の化合物のうち、トリメチルアミン、メチマゾール、イトプリド、トザセルチブが本反応を抑制した。そこで、ベンジダミン、トリメチルアミン、イトプリドおよびトザセルチブ *N*-酸化酵素活性ならびにメチマゾール、スリダグスルフィド *S*-酸化酵素活性に対し、それぞれ共存薬物の抑制作用を評価した。共存薬物がもたらす FMO3 指標薬物酸化酵素活性の抑制は、野生型と比較して FMO3 遺伝子多型によって異なり、特に p. (Arg205Cys) 変異体が触媒するスリダグスルフィドおよびメチマゾール *S*-酸化酵素活性に対して他の共存薬物の阻害作用がより顕著に認められた。

さらに、FMO3 の基質としてスリダグスルフィドを用い、FMO3 野生型および p. [(Glu158Lys;Glu308Gly)] 変異型酵素の酸化酵素活性に対して共存薬物の抑制作用を評価し、遺伝子多型の影響を調べた。用いた酵素源は大腸菌発現系を用いて調製した野生型および変異型 FMO3 ならびに遺伝子型を判定した個別ヒト肝マイクロゾームとした。個別ヒト肝マイクロゾームまたは大腸菌膜に発現させたリコンビナント FMO3 タンパク質のスリダグスルフィド *S*-酸化酵素活性に対してメチマゾールの競合的な阻害が認められた。本反応の速度論的解析から、メチマゾールの阻害定数  $K_i$  値はスリダグスルフィドの  $K_m$  値よりも低値であった。医薬品の臨床血中濃度情報とこれらの結果を活用しメチマゾールの併用時のスリダグスルフィド血中濃度 - 時間曲線下面積 (AUC) 上昇率を算出したところ、FMO3 野生型に比較して変異型で AUC 上昇率が高いことが予測された。以上、FMO3 が関与する *S*-含有化合物の酸化的代謝に起因する薬物相互作用が予測され、p. [(Glu158Lys;Glu308Gly)] FMO3 変異をもつ場合にその影響が大きいことが推察された。

FMO3 の酵素機能に影響を与えるアミノ酸置換を伴う遺伝子変異が国内外で報告されている。日本人における FMO3 酵素活性に影響を与える遺伝子変異の検索を、ボランティアの尿試料を用いて検討を行った。その結果、本研究によって新規 FMO3 遺伝子変異 6 種を見出した。アミノ酸置換変異を有する FMO3

リコンビナント酵素の酵素活性は野生型に比較して低値を示し、FM03 酵素機能に影響する可能性が推察された。以上、FM03 遺伝子多型が本酵素の関わる医薬品代謝消失および薬物相互作用の個人差の原因となる可能性が推察された。

さらに、実験動物の FM0 の薬物代謝酵素活性について、肝ミクロゾームおよびリコンビナント酵素を用いて相互作用検討の基盤を整備した。ヒト、サル、ミニプタおよびラットの肝ミクロゾームおよびリコンビナント FM01 および 3 を用いて、ベンジダミンおよびトザセルチブ *N*-酸化酵素活性ならびにメチマゾールおよびスリダクスルフィド *S*-酸化酵素活性を測定した。ヒトおよびサル肝の主要分子種は FM03 であったが、ラット肝では FM01 および FM03 の双方が酵素機能を担い、マイクロミニピグ肝で見出された高い触媒機能には、FM01 が主要な役割を果たしていることが推察された。これらの成果を受け、ヒト肝移植マウスを用いたベンジダミンの体内動態研究に着手し、ヒトおよびマウスの FM01 および FM03 の総合的な相互作用研究が可能となった。

#### 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)

Shimizu, M., Origuchi, Y., Ikuma, M., Mitsuhashi, N., and Yamazaki, H. Analysis of six novel flavin-containing monooxygenase 3 (FM03) gene variants found in a Japanese population suffering from trimethylaminuria. *Mol. Genet. Metab. Report*, 5, 89-93, 2015. 査読有  
doi:10.1016/j.ymgmr.2015.10.013

Uehara, S., Uno, Y., Inoue, T., Murayama, N., Shimizu, M., Sasaki, E., and Yamazaki, H. Activation and deactivation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) by cytochrome P450 enzymes and flavin-containing monooxygenases in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Drug Metab. Dispos.* 43, 735-742, 2015. 査読有  
doi: 10.1124/dmd.115.063594.

Fukami, K., Yamagishi, S., Sakai, K., Kaida, Y., Yokoro, M., Ueda, S., Wada, Y., Takeuchi, M., Shimizu, M., Yamazaki, H., and Okuda, S. Oral L-carnitine supplementation increases trimethylamine-N-oxide, but reduces markers of vascular injury in hemodialysis patients.

*J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 65, 289-295, 2015. 査読有  
doi: 10.1097/FJC.000000000000197.

Taniguchi-Takizawa, T., Shimizu, M., Kume, T., and Yamazaki, H. Benzylamine N-oxygenation as an index for flavin-containing monooxygenase activity and benzylamine N-demethylation by cytochrome P450 enzymes in liver microsomes from rats, dogs, monkeys, and humans. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 30, 64-69, 2015 査読有  
doi: 10.1016/j.dmpk.2014.09.006.

Shimizu, M., Shiraishi, A., Sato, A., Nagashima, S., and Yamazaki, H. Potential for drug interactions mediated by polymorphic flavin-containing monooxygenase 3 in human livers. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 30, 70-74, 2015 査読有  
doi: 10.1016/j.dmpk.2014.09.008.

Shimizu, M., Iwano, S., Uno, Y., Uehara, S., Inoue, T., Murayama, N., Onodera, J., Sasaki, E., and Yamazaki, H. Qualitative de novo analysis of full length cDNA and quantitative analysis of gene expression for common marmoset (*Callithrix jacchus*) transcriptomes using parallel long-read technology and short-read sequencing. *PLoS One*, 9, e100936, 2014 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0100936. eCollection 2014.

Yamazaki, M., Shimizu, M., Uno, Y., and Yamazaki, H. Drug oxygenation activities mediated by liver microsomal flavin-containing monooxygenases 1 and 3 in humans, monkeys, rats, and minipigs. *Biochem. Pharmacol.*, 90, :159-165, 2014. 査読有  
doi: 10.1016/j.bcp.2014.04.019.

Ozasa, H., Shimizu, M., Koizumi, A., Wakabayashi, A., and Yamazaki, H. Trimethylamine generation in patients receiving hemodialysis treated with L-carnitine. *Clin. Kidney J.*, 7, 329, 2014 査読有  
doi: 10.1093/ckj/sfu045.

Shimizu, M., Allerston, C. K., Shephard, E. A., Yamazaki, H., and

Phillips, I. R. Relationships between flavin-containing monooxygenase 3 (FM03) genotype and trimethylaminuria phenotype in a Japanese population, *Brit. J. Clin. Pharmacol.*, 77, 839-851, 2014 査読有  
doi: 10.1111/bcp.12240.

Uno, Y., Shimizu, M., and Yamazaki, H. Molecular and functional characterization of flavin-containing monooxygenases in cynomolgus macaque. *Biochem. Pharmacol.*, 85, 1837-1847, 2013. 査読有  
doi: 10.1016/j.bcp.2013.04.012.

Yamazaki, H. and Shimizu, M. Survey of variants of human flavin-containing monooxygenase 3 (FM03) and their drug oxidation activities. *Biochem. Pharmacol.*, 85, 1588-1593, 2013. 査読有  
doi: 10.1016/j.bcp.2013.03.020.

〔学会発表〕(計 18 件)

牧野美紀、清水万紀子、徳山瑛美、梶谷綾、渡邊碧、山崎浩史、日本人におけるトリメチルアミン尿症の一因となる新規フラビン含有モノオキシゲナーゼ3ハプロタイプの解析、日本薬学会第136年会、2016年3月29日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

徳山瑛美、清水万紀子、牧野美紀、梶谷綾、渡邊碧、山崎浩史、日本人におけるトリメチルアミン尿症の原因となる新規フラビン含有モノオキシゲナーゼ3遺伝子変異の解析、日本薬学会第136年会、2016年3月29日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Shimizu, M., Yamazaki, H., Flavin-containing monooxygenase 3: Individual differences and drug interactions, 30th JSSX Annual Meeting, 2015年11月13日(東京江戸川区)

Shimizu, M., Non-P450 drug-metabolizing enzyme flavin-containing monooxygenase: polymorphisms and interactions, 30th JSSX Annual Meeting, 2015年11月13日(東京江戸川区)

千葉布季子、清水万紀子、牧野美紀、三觜菜々子、友田沙也加、山崎浩史、日本人のトリメチルアミン尿症に関する大規模調査、第69回聖マリアンナ医科大学

学医学会学術集会、2015年6月27日(神奈川県川崎市)

Shimizu, M., Yamazaki, H., Mutations of flavin-containing monooxygenase 3 (FM03) gene responsible for trimethylaminuria, 19th International Conference on Cytochrome P450, 2015年6月12日、国立オリンピック記念青少年総合センター(東京都渋谷区)

千葉布季子、清水万紀子、徳山瑛美、牧野美紀、山崎浩史、日本人トリメチルアミン尿症の大規模詳細調査、日本薬学会第135年会、2015年3月27日、デザイン・クリエイティブセンター神戸(兵庫県神戸市)

伊熊鞠佳、清水万紀子、三觜菜々子、友田沙也加、山崎浩史、日本人のトリメチルアミン尿症の一因となるフラビン含有モノオキシゲナーゼ3遺伝子変異の解析、2014年12月12日、第68回聖マリアンナ医科大学学術集会、聖マリアンナ医科大学(神奈川県川崎市)

清水万紀子、折口裕美、伊熊鞠佳、三觜菜々子、友田沙也加、山崎浩史、日本人集団から見出されたトリメチルアミン尿症の原因となるフラビン含有酸素添加酵素3遺伝子多型、第35回日本臨床薬理学会学術総会、2014年12月4日、愛媛看護研修センター(愛媛県松山市)

小泉綾乃、若林あかり、清水万紀子、小篠榮、山崎浩史、レボカルニチン投与時の透析患者におけるトリメチルアミンおよびN-酸化体の体内運命の検討、第58回日本薬学会関東支部大会、2014年10月4日、昭和薬科大学(東京都町田市)

Shimizu, M., Yamazaki, H., Genetic polymorphisms in flavin-containing monooxygenase 3 (FM03) gene responsible for trimethylaminuria in a Japanese population, 19th North American ISSX / 29th JSSX Meeting, 2014年10月21日、Hilton San Francisco Union Square Hotel(サンフランシスコ、米国)

清水万紀子、佐藤歩、石井有紀、白石有紗、村山典恵、山崎浩史、ヒトフラビン含有酸素添加酵素3が関与する薬物相互作用、日本薬学会第134年会、2014年3月28日、熊本市総合体育館(熊本県熊本市)

Shimizu, M. and Yamazaki, H., Polymorphic human flavin-containing monooxygenase 3 (FM03)-mediated drug interactions, SOT 53rd Annual Meeting and ToxExpo, 2014年3月24日, West and North Buildings at the Phoenix Convention Center (フェニックス, 米国)

小泉綾乃、清水万紀子、若林あかり、村山典恵、小篠榮、山崎浩史、レボカルニチン投与時の透析患者におけるトリメチルアミンおよび N-酸化体の体内動態の検討、第 66 回聖マリアンナ医科大学医学会学術集会、2013 年 12 月 13 日、聖マリアンナ医科大学 (神奈川県川崎市)

清水万紀子、加瀬愛幸、石井有紀、山崎美穂、山崎浩史、日本人トリメチルアミン尿症の一因となるフラビン含有酸素添加酵素 3 遺伝子多型、第 34 回日本臨床薬理学会学術総会、2013 年 12 月 4 日、東京国際フォーラム (東京都千代田区)

Shimizu, M., Shephard, E., Phillips, I.R., Yamazaki, H., Flavin-containing monooxygenase 3 (FM03) genotype and phenotype in a Japanese cohort, 日本薬物動態学会 第 28 回年会, 2013 年 10 月 9 日, タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

清水万紀子、山崎浩史、成長に伴う薬物酸化酵素フラビン含有モノオキシゲナーゼの個人変動、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2013、2013 年 8 月 31 日、熊本大学薬学部 (熊本県熊本市)

Shimizu, M., Shephard, E., Phillips, I.R., Yamazaki, H. Flavin-containing monooxygenase 3 (FM03) haplotypes in a Japanese population, ICCP450, 2013 年 6 月 21 日, The University of Washington (シアトル, 米国)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 万紀子 (SHIMIZU, Makiko)  
昭和薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：90307075

### (2) 研究分担者

山崎 浩史 (YAMAZAKI, Hiroshi)  
昭和薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：30191274

村山 典恵 (MURAYAMA, Norie)  
昭和薬科大学・薬学部・講師