

令和 4 年 5 月 7 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07063

研究課題名(和文) ヒトCYP2J2活性を強力かつ選択的に阻害する医薬品の探索と抗腫瘍効果の解析

研究課題名(英文) Exploration of drugs to potently and selectively inhibit human CYP2J2 activity and evaluation of their antitumor effect on human tumor cell lines

研究代表者

山折 大 (YAMAORI, Satoshi)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40360218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はCYP2J2活性を強力かつ選択的に阻害する降圧薬を見出し、このような薬剤が抗腫瘍効果を示すか否か、また分子標的薬の有効性を高めるか否かを細胞レベルで明らかにすることを目的とした。申請者らが見出したCYP2J2活性を強力に阻害する降圧薬(14化合物)のうち、アゼルニジピンがCYP2J2に対して高い選択性をもつ阻害剤である可能性が示された。また、アゼルニジピンを含む多くの降圧薬がヒト腫瘍株化細胞に対して増殖抑制作用(抗腫瘍効果)を示したが、分子標的薬の有効性(抗腫瘍効果)を高める可能性のある降圧薬を見出すことはできなかった。今後、CYP2J2が多く存在する細胞を用いて検証する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、申請者らが見出したCYP2J2活性を強力に阻害する降圧薬のうち、アゼルニジピンがCYP2J2活性を選択的に阻害し、さらにヒト腫瘍株化細胞の増殖を強く抑制する可能性が示唆された。本研究成果を基盤にして、今後、より詳細な解析が進めば、抗がん薬の副作用(高血圧)の軽減だけでなく、抗腫瘍効果の増強にも大きく寄与する薬剤の創出が期待される。

研究成果の概要(英文)：Inhibitory effects of antihypertensive drugs on catalytic activities of major drug-metabolizing CYP enzymes (CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4) were examined with human liver microsomes to clarify the inhibition selectivity for CYP2J2. Furthermore, antitumor effects of antihypertensive drugs were investigated with human tumor cell lines. Among the antihypertensive drugs tested, it was suggested that azelnidipine shows a highly selective inhibition against CYP2J2. A lot of antihypertensive drugs exhibited antiproliferative effects on human tumor cell lines (GIST-T1 and SK-HEP-1), although no drugs to potentiate antiproliferative effects of sorafenib and sunitinib were found under the current conditions. Further studies are needed to evaluate antitumor effects of antihypertensive drugs with cell lines highly expressing CYP2J2.

研究分野：薬物代謝学

キーワード：降圧薬 CYP2J2 分子標的薬 抗腫瘍効果

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍の増殖や転移を促進するエポキシエイコサトリエン酸の生成に関与するシトクロム P450 2J2 (CYP2J2) の阻害剤の探索が、がん治療薬開発における新たな戦略の1つとして世界的に注目されている。CYP2J2 は当初、内因性物質代謝型 P450 として同定されたが、薬物代謝型酵素としての側面も併せ持つ。最近、CYP2J2 がソラフェニブやスニチニブなどの分子標的薬を代謝することが明らかにされ、腫瘍細胞内に発現する CYP2J2 がこれら分子標的薬の抗腫瘍効果に影響を及ぼす可能性が示唆されている。また、ソラフェニブおよびスニチニブは腫瘍血管新生に関与する血管内皮増殖因子受容体のチロシンキナーゼ活性を阻害するが、正常な血管内皮細胞に対しても同様の阻害作用を示すことから、副作用として高血圧を生じる。そのため、各適正使用ガイドラインでは、高血圧が生じた際には降圧薬の投与が推奨されている。もし併用する降圧薬の中に強力な CYP2J2 阻害作用を示すものがあれば、副作用の軽減だけでなく腫瘍増殖を抑制し分子標的薬の有効性を高める可能性があると考えられる。これまでに、一部の降圧薬が CYP2J2 活性を阻害することが報告されているが、他の多くの降圧薬の阻害作用は不明であった。そこで、申請者らは種々の降圧薬を用いて CYP2J2 活性に対する阻害効果を検討した結果、アゼルニジピンおよびマニジピンを含む多くの降圧薬が CYP2J2 活性を強力に阻害することを明らかにした。しかし、これらの降圧薬が CYP2J2 活性を選択的に阻害するか否かは不明である。さらに、降圧薬が抗腫瘍効果を示したり、分子標的薬の有効性を高めるか否かも明らかでない。

### 2. 研究の目的

CYP2J2 活性を強力かつ選択的に阻害する降圧薬を見出し、このような薬剤が抗腫瘍効果を示すか否か、また分子標的薬の有効性を高めるか否かを細胞レベルで明らかにする。

(1) 申請者らが見出した CYP2J2 活性を強力に阻害する降圧薬が他の CYP 分子種の活性を阻害するか否か明らかにする。

(2) 申請者らが見出した CYP2J2 阻害作用を有する降圧薬がヒト腫瘍株化細胞における CYP2J2 の発現および増殖能に対してどのような影響を及ぼすのか明らかにする。

(3) 申請者らが見出した CYP2J2 阻害作用を有する降圧薬が分子標的薬であるソラフェニブおよびスニチニブの増殖抑制作用に対してどのような影響を及ぼすのか明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 各 CYP 分子種の活性の指標として、7-エトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化酵素活性 (CYP1A2)、*S*-ワルファリン 7-水酸化酵素活性 (CYP2C9)、デキストロメトルファン *O*-脱メチル化酵素活性 (CYP2D6) およびジルチアゼム *N*-脱メチル化酵素活性 (CYP3A4) を用いた。ヒト肝ミクロゾーム、基質および降圧薬の混合液を NADPH 存在下で反応させた後、上記酵素活性を測定した。酵素活性を阻害した場合、 $IC_{50}$  値を算出した。

(2) ヒト腫瘍株化細胞として、消化管間質腫瘍由来 GIST-T1 細胞、肝癌由来 HepG2 細胞および SK-HEP-1 細胞、腎癌由来 ACHN 細胞および Caki-1 細胞を用いた。各ヒト腫瘍株化細胞における CYP2J2 の発現をリアルタイム PCR 法により解析した。また、ヒト腫瘍株化細胞に各降圧薬 (0.1、1、10  $\mu$ M) を 24 時間処理した後に、WST-1 アッセイを行った。

(3) ヒト腫瘍株化細胞として、GIST-T1 細胞および SK-HEP-1 細胞を用いた。ヒト腫瘍株化細胞に分子標的薬であるソラフェニブおよびスニチニブを 24 時間処理した後に、WST-1 アッセイを行った。また、各降圧薬 (0.1、1  $\mu$ M) の存在下でソラフェニブまたはスニチニブを 24 時間処理し、WST-1 アッセイを行った。

### 4. 研究成果

(1) CYP1A2 活性はアムロジピン、シルニジピンおよびニソルジピンによって阻害され、 $IC_{50}$  値は 2.58 ~ 3.41  $\mu$ M であった。CYP2C9 活性は検討した全ての降圧薬 (アムロジピン、アゼルニジピン、バルニジピン、ベニジピン、シルニジピン、エホニジピン、フェロジピン、マニジピン、ニカルジピン、ニフェジピン、ニルバジピン、ニソルジピン、ニトレンジピン、テルミサルタン) によって阻害され、 $IC_{50}$  値は 0.283 ~ 7.40  $\mu$ M であった。CYP2D6 活性はアゼルニジピン、バルニジピン、ベニジピン、シルニジピン、マニジピン、ニカルジピンによって阻害され、1.13 ~ 5.45  $\mu$ M であった。CYP3A4 活性はアゼルニジピン、バルニジピン、ベニジピン、シルニジピン、エホニジピン、フェロジピン、マニジピン、ニカルジピン、ニフェジピン、ニソルジピンおよびニトレン

ジピンによって阻害され、 $IC_{50}$  値は  $0.123 \sim 10.4 \mu\text{M}$  であった。検討した降圧薬のうち CYP2J2 活性を最も強力に阻害するアゼルニジピン ( $IC_{50}$  値  $0.137 \mu\text{M}$ ) および マニジピン ( $IC_{50}$  値  $0.116 \mu\text{M}$ ) について阻害効果を比較したところ、アゼルニジピンは CYP2J2 に対して少なくとも 10 倍高い選択性を示し、マニジピンは CYP2J2 に対して約 3 倍高い選択性を示した。これらのことから、アゼルニジピンは CYP2J2 活性を強力かつ選択的に阻害する降圧薬であることが示唆された。

(2) GIST-T1 細胞、HepG2 細胞、SK-HEP-1 細胞、ACHN 細胞および Caki-1 細胞における CYP2J2 の発現を解析した結果、CYP2J2 はいずれの細胞においても mRNA レベルで検出された。次に、ヒト腫瘍株化細胞の増殖能に対する降圧薬の影響を WST-1 アッセイにより解析した結果、GIST-T1 細胞に対しては、ニフェジピンを除く全ての降圧薬が  $10 \mu\text{M}$  処理時に増殖能を有意に低下させた。減少率は  $12.7 \sim 95.6\%$  で、アゼルニジピンが最も強い増殖抑制作用を示した。また、SK-HEP-1 細胞に対しては、ニフェジピン、ニルバジピン、ニトレンジピンを除く全ての降圧薬が  $10 \mu\text{M}$  処理時に有意な増殖能の低下を示した。減少率は  $11.9 \sim 95.2\%$  で、アゼルニジピンが最も強い増殖抑制作用を示した。これらのことから、解析に用いた多くの降圧薬はこれらヒト腫瘍株化細胞に対して増殖抑制作用を示すことが明らかとなった。

(3) ヒト腫瘍株化細胞の増殖能に対するソラフェニブおよびスニチニブの影響を WST-1 アッセイにより解析した結果、両分子標的薬は GIST-T1 細胞および SK-HEP-1 細胞に対して増殖抑制作用を示した。GIST-T1 細胞および SK-HEP-1 細胞に対するソラフェニブの増殖抑制作用 ( $IC_{50}$  値) はそれぞれ  $0.0323 \mu\text{M}$  および  $3.18 \mu\text{M}$  であり、スニチニブの増殖抑制作用 ( $IC_{50}$  値) はそれぞれ  $0.0717 \mu\text{M}$  および  $7.11 \mu\text{M}$  であった。次に、降圧薬がこれら分子標的薬の増殖抑制作用に対してどのような影響を及ぼすのか検討した。GIST-T1 細胞においては、いずれの降圧薬もソラフェニブおよびスニチニブの増殖抑制作用を有意に増強しなかった。また、SK-HEP-1 細胞においても、多くの降圧薬は両分子標的薬の増殖抑制作用に影響を及ぼさなかったが、アムロジピン、アゼルニジピン、ベニジピン、シルニジピンおよびマニジピンはソラフェニブの増殖抑制作用を有意に減弱した。これらの結果から、少なくとも本実験条件下では、分子標的薬の有効性を高める可能性のある降圧薬を見出すことはできなかった。

今後、これらヒト腫瘍株化細胞に CYP2J2 を強制的に高発現させた細胞株を用いて検証する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Noriaki Ikemura, Satoshi Yamaori, Chinatsu Kobayashi, Shinobu Kamijo, Norie Murayama, Hiroshi Yamazaki, Shigeru Ohmori	4. 巻 306
2. 論文標題 Inhibitory effects of antihypertensive drugs on human cytochrome P450 2J2 activity: Potent inhibition by azelnidipine and manidipine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemico-Biological Interactions	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cbi.2019.04.005	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 Shusuke Ozawa, Satoshi Yamaori, Kaori Aikawa, Shinobu Kamijo, Shigeru Ohmori	4. 巻 258
2. 論文標題 Expression profile of cytochrome P450s and effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and antiepileptic drugs on CYP1 expression in MOG-G-CCM cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 118140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2020.118140	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山折 大, 池村憲明, 小林千夏, 上条しのぶ, 村山典恵, 山崎浩史, 大森 栄
2. 発表標題 ヒトCYP2J2活性に対する降圧薬の阻害効果
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 山折 大
2. 発表標題 薬物および内因性物質の代謝的相互作用に着目したP450阻害剤の機構解析に関する研究
3. 学会等名 日本薬物動態学会第35回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小澤秀介, 山折 大, 相川香織, 上条しのぶ, 大森 栄
2. 発表標題 ヒトアストロサイト由来MOG-G-CCM細胞における抗てんかん薬と多環芳香族炭化水素によるCYP1遺伝子の発現誘導能の解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

「CYP2J2に対する降圧薬の阻害効果」に関する研究成果が【CBI】に掲載  
<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/department/master/i-pharm/information/2019/10/cyp2j2chemico-biological-interactions.html>

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

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