

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460206

研究課題名(和文) サリドマイドのヒト体内動態を考慮した肝と胎盤による代謝的活性化と解毒反応の評価

研究課題名(英文) Evaluation of Human Cytochrome P450 3A Enzymes in Hepatic and Placental Cells by Thalidomide and Relevance to Bioactivation

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：サリドマイドのヒトにおける代謝的活性化には、活性化酵素であるヒトチトクロム P450 3A 酵素の自己誘導と、P450 3A の協同性を示す芳香環酸化反応が重要であることを提示した。ヒト肝移植マウスにサリドマイドを経口投与したところ、ヒト不均衡性代謝物となる芳香環5-水酸化サリドマイドがヒト肝移植マウスの血中に見出され、ヒト反応性代謝物が多様なヒト肝タンパク質分子種に非特異的に結合することを、二次元電気泳動によるプロテオミクス手法と加速器型質量分析による超低濃度¹⁴C放射能測定を組み合わせることで明らかにした。ヒトP450 3A人工染色体を有するマウスにてサリドマイドの奇形発生を確認した。

研究成果の概要(英文)： Simulation of human plasma concentrations of the teratogen thalidomide and its human metabolites is possible with a simplified physiologically-based pharmacokinetic model based on data obtained in mice with humanized liver. In vivo non-specific hepatic protein binding parameters of metabolically activated [¹⁴C]-5-hydroxythalidomide and subsequent metabolic activation in humanized liver mice can be analyzed by accelerator mass spectrometry. Human placental microsomal fractions showed detectable thalidomide 5-hydroxylation activities. Thalidomide significantly induced P450 3A4/3A5 and pregnane X receptor (PXR) mRNA levels 2- to 3-fold in human placental BeWo cells cultured with a modified medium. Thalidomide also significantly induced midazolam 1'-hydroxylation and thalidomide 5-hydroxylation activities 3-fold. Taken together, activation of thalidomide to 5-hydroxythalidomide with autoinduction of P450 3A enzymes in human placentas, as well as livers, is suggested in vivo.

研究分野：薬物代謝学

キーワード：サリドマイド

1. 研究開始当初の背景

サリドマイドの催奇形性の出現には、ヒトと動物で明かな種差が認められている。研究代表者らは、サリドマイドのヒト薬物代謝酵素チトクロム P450 (P450) の一次代謝物 5-水酸化体が、さらに芳香環の酸化反応を受けたヒト型反応性代謝物を、グルタチオン付加体として世界ではじめて捕捉した (Chem Res Toxicol, 23, 1018, 2010)。薬物代謝領域では、米国 FDA が定めた代謝物の安全性試験に関するガイダンスにおいて、動物よりヒトにおける血漿中濃度が高い代謝物は不均衡性代謝物と定義されている。サリドマイドのヒト体内動態を考慮した肝と胎盤による不均衡性代謝物の生成、代謝的活性化と解毒反応の評価を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト胎盤と肝の双方の系を活用し、活性化と解毒のバランスの上でサリドマイド反応性代謝物を補足し、ヒト特有な毒性発現バイオマーカーを *in vitro* および *in vivo* にて詳細に解析することを目的とした。学外より酵素源としてヒト胎盤とヒト肝さらにヒト肝移植マウス生体を、基質として光学活性体サリドマイドおよびその一次代謝物を入手した。これらを活用し、サリドマイド反応性代謝物のヒト型モデル動物に及ぼす影響を、最先端のヒト肝移植モデルを使って医療薬学的・毒性学的に明かにすることとした。サリドマイド一次代謝物 5-水酸化体が、さらに芳香環の酸化反応を受けたヒト型反応性代謝物が生体内での生成と活性化された医薬品の結合タンパクについて検討した。

本研究では、医薬品由来物質の代謝と解毒のバランスおよび反応性代謝物と生体標的の関係について総括し、医薬品の代謝的活性化および解毒を考慮した毒性リスク評価系を確立することを目指した。1) 生理学的薬物動態 (PBPK) モデル手法の活用、2) ヒト胎盤および肝での薬物代謝機能の探索、3) リスク評価に有効な肝特異的バイオマーカーの探索等の観点から研究成果をまとめた。

3. 研究の方法

ヒト胎盤の入手に関しては国内にて正常分娩時の医療廃棄物を確保する準備が整った。ヒト肝は、フランス国立衛生研究所の薬物代謝酵素活性を保持する HepaRG 細胞とヒト肝細胞移植マウスを利用する準備を整えた。肝細胞培養系でより生理的な条件下を再現するに当たり培地中の内因性ホルモンの影響は無視できないものである一方で、その影響について詳細な報告は少ない。薬物相互作用ガイドラインに関連した酵素誘導や阻害に

ついて検討するにあたり、定常状態の発現はこれらホルモンの影響を顕著に受けることから、特に培地添加物に高濃度で含まれるハイドロコルチゾンについて、酵素誘導作用への影響を検討した。機能維持を目的とした培養法として液滴レベルの小規模スケールにおいて肝細胞機能を維持する三次元培養プレート (ハンギングプレート) が輸入されている。そこでこの新培養器材を用い、ヒト初代培養肝細胞あるいは HepaRG 細胞を培養し、当初の母胎における酵素活性変動など、生体側の代謝酵素の変動を評価する目的を培養細胞系にて遂行した。

4. 研究成果

本研究では、ヒトに特徴的であり、不均衡性代謝物と判断される血漿中濃度が高いサリドマイド代謝物について、ヒト肝移植キメラマウスを用いて体内動態を詳細に検討した。ヒトにおいて主要代謝物であるサリドマイドの芳香環が二重に酸化された後のグルタチオン付加体を LC/MS-MS にて捕捉し、反応性代謝物の血中濃度時間推移を明らかにした。ヒトで 1 日 1 回サリドマイド 100 mg を 14 日間連続投与した際の血中濃度を予測したところ、反応性代謝物の前駆体となる芳香環の酸化体は親化合物の 1/30 レベルで推移することが生理学的薬物動態 (PBPK) モデル手法により予測された。ヒト特異性肝毒性の原因と考えられる反応性代謝物が、ヒト肝細胞を移植マウス生体中にて、多様なヒト肝タンパク質分子種に非特異的に結合することを、二次元電気泳動によるプロテオミクスの手法と加速器型質量分析による超低濃度 ^{14}C 放射能測定を組み合わせることで明らかにした。さらにヒト P450 3A 人工染色体を有するマウスにてサリドマイドの奇形発生を確認した。

液滴レベルの小規模スケールにおいて肝細胞機能を維持する新三次元培養培養器材 (ハンギングプレート) を用い、ヒト初代培養肝細胞あるいは HepaRG 細胞を培養し、生体側の代謝酵素の変動を評価した。サリドマイド添加による P450 3A および 2B 分子種の mRNA レベルはハイドロコルチゾン添加量に依存して上昇が認められた。P450 3A の基質であるミダゾラム水酸化酵素活性、P450 2B の基質であるブプロピオン水酸化酵素活性についてはいずれも mRNA レベルの上昇に伴って増加傾向が認められたことから、生理的条件下で化合物の酵素誘導効果を検討するには、ハイドロコルチゾンの添加により影響を受けることが明らかとなった。高濃度でハイドロコルチゾンを添加すると、基底レベルのタンパク発現が上昇し、見かけの誘導効果が減弱して観察される可能性が示唆された。

ヒト胎盤由来 BeWo 細胞は、これまでヒト肝代謝酵素 P450 1A2, 3A について mRNA レベルでは確認されているが、酵素誘導に関する応答性について詳細な報告はない。培養ヒト胎盤細胞を用いた代謝酵素活性測定系の構築を試みたところ、代表的な肝薬物代謝酵素の誘導剤について3日間の培地への添加により P450 3A mRNA に対する影響が認められた。

以上の結果から、本研究においてサリドマイドのヒトにおける代謝的活性化には、活性化酵素であるヒトチトクロム P450 3A 酵素の自己誘導と、P450 3A の協同性を示す芳香環酸化反応が重要であることを提示した。ヒト肝移植マウスにサリドマイドを経口投与したところ、ヒト不均衡性代謝物となる芳香環5-水酸化サリドマイドがヒト肝移植マウスの血中に見出され、ヒト反応性代謝物が多様なヒト肝タンパク質分子種に非特異的に結合することを、二次元電気泳動によるプロテオミクスの手法と加速器型質量分析による超低濃度 ¹⁴C 放射能測定を組み合わせて明らかにした。ヒト P450 3A 人工染色体を有するマウスにてサリドマイドの奇形発生を確認した。

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9件)

1. Murayama, N., Kazuki, Y., Satoh, D., Arata, K., Harada, T., Shibata, N., Guengerich, F. P., and Yamazaki, H. Induction of human cytochrome P450 3A enzymes in cultured placental cells by thalidomide and relevance to bioactivation and toxicity, J. Toxicol. Sci., 査読有, in press.
2. Yamazaki, H. Differences in toxicological and pharmacological responses mediated by polymorphic cytochromes P450 and related drug-metabolizing enzymes, Chem. Res. Toxicol., 査読有, 30, 53-60, 2017, doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00286
3. Yamazaki, H., Suemizu, H., Kazuki, Y., Oofusa, K., Kuribayashi, S., Shimizu, M., Ninomiya, S., Horie, T., Shibata, N., and Guengerich, F.P., Assessment of protein binding of 5-hydroxythalidomide bioactivated in humanized mice with human P450 3A-chromosome or hepatocytes by two-dimensional electrophoresis/accelerator mass spectrometry, Chem. Res. Toxicol. 査読有, 29, 1279-1281, 2016, doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00136
4. Yamazaki, H., Suemizu, H., Mitsui, M., Shimizu, M., and Guengerich, F.P. Combining Chimeric mice with humanized liver, mass spectrometry, and physiologically-based pharmacokinetic modeling in toxicology, Chem. Res. Toxicol. 査読有, 29,1903-1911, 2016, doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00136
5. Kazuki, Y., Akita, M., Kobayashi, K., Osaki, M., Satoh, D., Abe, S., Takehara, S., Kazuki, K., Yamazaki, H., Kamataki, T., and Oshimura, M., Thalidomide-induced limb abnormalities in a humanized CYP3A mouse model, Sci. Rep, 査読有, 6, 21319, 2016, doi:10.1038/srep21419
6. Nishiyama, S., Suemizu, H., Shibata, N., Guengerich, F. P., and Yamazaki, H., Simulation of human plasma concentrations of thalidomide and primary 5-hydroxylated metabolites explored with pharmacokinetic data in humanized TK-NOG mice, Chem. Res. Toxicol., 査読有, 28, 2088-2090, 2015, doi: 10.1021/acs.chemrestox.5b00381
7. Murayama, N., Usui, T., Slawny, N., Chesne, C., and Yamazaki, H, Human HepaRG cells can be cultured in hanging-drop plates for cytochrome P450 induction and function assays, Drug Metab. Lett., 査読有, 9, 268-278, 2015, doi: 10.2174/1872312809666150119104806
8. Yamazaki, H., Kuribayashi, S., Inoue, T., Honda, T., Tateno, C., Oofusa, K., Ninomiya, S., Ikeda, T., Izumi, T., and Horie, T. Zone analysis by two-dimensional electrophoresis with accelerator mass spectrometry of *in vivo* protein bindings of idiosyncratic hepatotoxicants troglitazone and flutamide bioactivated in chimeric mice with humanized liver. Toxicol. Res., 査読有, 4, 106-111, 2015, doi: 10.1039/C4TX00068D
9. 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., Yamazaki, H., Thalidomide increases human hepatic cytochrome P450 3A enzymes by direct activation of pregnane X receptor, Chem. Res. Toxicol. 査読有, 27, 304-308, 2014, doi: 10.1021/tx4004374

[学会発表](計10件)

1. Hiroshi Yamazaki, Human and monkey

- P450 metabolism for human-specific metabolite formation, 11th International ISSX meeting(招待講演)(国際学会)2016年6月12日~16日 釜山(韓国)
2. Hiroshi Yamazaki, Makiko Shimizu, Activation of thalidomide to reactive metabolites by autoinduced human cytochrome P450 3A enzymes with substrate cooperativity, The 21st International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (国際学会)2016年10月2日~6日, Davis, California (USA)
 3. Hiroshi Yamazaki, Combining mice with humanized liver, mass spectrometry, and physiologically-based pharmacokinetic modeling, The 31st JSSX Annual Meeting (招待講演)2016年10月13日~15日、キッセイ文化会館(長野県・松本市)
 4. 山崎浩史, ヒトと実験動物との代謝の種差、第42回日本毒性学会年会(金沢)(招待講演)2015年6月30日~7月2日、金沢日航ホテル(石川県・金沢市)
 5. Hiroshi Yamazaki, Comparison of drug oxidations in humans, primates, and rodents, 13th Meeting of the Asia Pacific Federation of Pharmacologists (Bangkok) (招待講演)(国際学会), 2016年2月1日~3日、Bangkok (Thai)
 6. 山崎浩史, ヒト薬物動態予測を目指したサル、マーモセットとヒト肝細胞移植マウスの活用研究、第38回薬物動態談話会年会(浜松)(招待講演), 2015年11月30日~12月1日、アクトシティホテル(静岡県・浜松市)
 7. Hiroshi Yamazaki, Comparison of drug oxidations in humans, primates, and rodents, 2015 JSSX / KAPS Joint Session, 30th JSSX Annual Meeting (Tokyo)(招待講演)(国際学会), 2015年11月12日~14日、江戸川区民センター(東京都・江戸川区)
 8. Hiroshi Yamazaki, Reactive metabolite formation of drugs by human P450s in chimeric mice with humanized liver, 19th North American ISSX/ 29th JSSX Annual Meeting (招待講演)2014年10月19日~23日、San Francisco, California (USA)
 9. Hiroshi Yamazaki, Metabolic activation and fate of xenobiotics determined by polymorphic drug-metabolizing enzymes, 19th North American ISSX/ 29th JSSX Annual Meeting (招待講演), 2014年10月19日~23日、San Francisco, California

(USA)

10. 山崎浩史, 医薬品開発におけるヒト代謝物研究の役割, 第41回日本毒性学会年会(招待講演)2014年7月2日~4日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計2件)

1. Hiroshi Yamazaki, Chowdhury, G. and Guengerich, F.P. Activation of Thalidomide to Reactive Metabolites by Autoinduced Human Cytochrome P450 3A Enzymes, with Substrate Cooperativity, and Implications for Development of Analogs. In: Advances in Medicine and Biology, Vol. 93, Ed. L.V. Berhardt, pp. 23-30, Hauppauge, NY, USA: Nova Science Publishers, Inc, 2016.
2. Hiroshi Yamazaki, Species, Ethnic, and Individual Differences in Human Drug-metabolizing Cytochrome P450 Enzymes, In; Fifty Years of Cytochrome P450 Research, ed. by Hiroshi Yamazaki, pp. 293-305, Springer, Tokyo, 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等 昭和薬科大学山崎浩史
<http://www.shoyaku.ac.jp/research/laboratory/doi/utai/teacher/96>

ORCID ID (0000-0002-1068-4261)
<http://orcid.org/0000-0002-1068-4261>

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

Scopus Author ID: 56049170400
<http://www.scopus.com/authid/detail.url?authorId=56049170400>

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：30191274

(2)研究分担者

村山 典恵 (MURAYAMA, Norie)
昭和薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：90219949

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

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし