

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

# 目 次

## 課題番号

### 第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

### 第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

### 第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

### 第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

## 組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発

所属 金沢大学薬学部  
研究者 山崎 浩史

### 要旨

ヒト肝ミクロソームと組換えP450による抗癌剤テガフルと抗てんかん薬フェニトインの代謝について検討した。代謝反応に重要な役割を果たすP450分子種の肝での発現量に著しい個人差があることが、これら医薬品の薬効・毒性の個人差の一因となることを指摘した。

### 1. 研究目的

実験動物との種差の問題から、ヒト由来の組織、培養細胞又はヒト酵素遺伝子発現系を用いてヒトにおける代謝反応を明らかにすることが必要となっている。薬物代謝反応のはじめの段階に重要な役割を果たすP450（以下CYPまたはP450）には多くの分子種があり、それらの肝での発現量に著しい個人差があることが医薬品の薬効・毒性の個人差の一因となることを、我々は指摘してきた。ヒトP450遺伝子発現系試薬も市販されているが、P450遺伝子を発現させた系（リンパ芽球、酵母、昆虫細胞、大腸菌等）によって、P450に電子を伝達し、薬物酸化活性に必須な酵素であるP450還元酵素量などに大きな違いがある。新規経口糖尿病薬トログリタゾンのように、用いた発現系の触媒活性の違いにより、ヒトP450による代謝を受けないと誤って報告された新薬もあり、医療現場での薬物相互作用等の評価や予測時における問題となっている。発現機構が未解明である薬物相互作用の一つにフェニトインとテガフルがある。抗てんかん薬フェニトインと抗癌剤テガフルを併用することによりフェニトインの血中濃度が上昇し、意識障害などのフェニトイン中毒と思われる臨床症状が現れることが報告されている。そこで本研究では、これらの薬物相互作用の発現機序を解明するために、ヒト肝ミクロソームと組換えヒトP450によるテガフルとフェニトインの代謝について検討を行った。

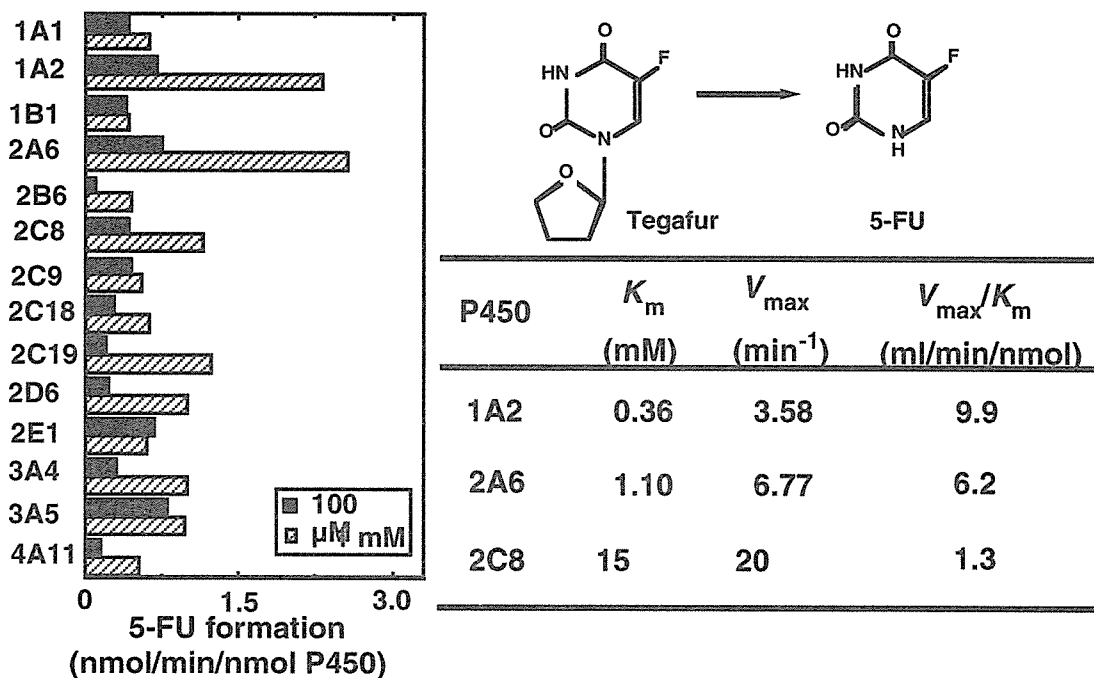


Fig.1. Kinetic analysis for 5-FU formation from tegafur by recombinant P450 enzymes

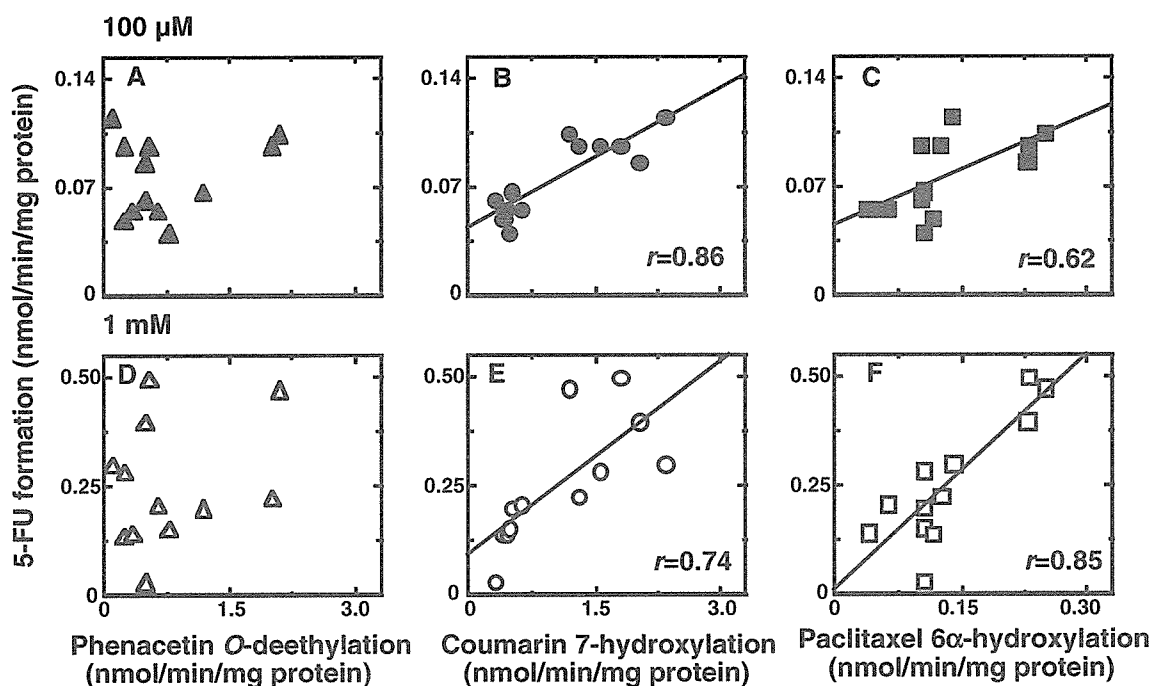


Fig.2. Relationship between 5-FU Formation activities and drug oxidation activities in 12 human liver microsomes

## 2. 研究方法

ヒト肝に存在する薬物代謝型の主要分子種であるCYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4およびCYP3A5について、NPRとの共発現pCWプラスミドを大腸菌に導入し、超遠心分離法によりその膜画分を調製した。さらに大腸菌膜を用いたP450共発現系にさらにNPRやチトクローム $b_5$  ( $b_5$ ) を添加して触媒活性の至適条件を検索した。市販のバキュロウイルスを用いたP450発現系の典型的な薬物代謝反応の条件の整理を行い、至適条件を明らかにした上で、本研究に用いた。

## 3. 研究成果

テガフルの構造式と市販の14種類のバキュロウイルスを用いた組換えP450酵素によるテガフルからの5-フルオロウラシル(5-FU)生成活性をFig.1に示した。ヒトにおける臨床血中濃度に相当するテガフル100  $\mu$ Mでは、CYP1A2、2A6、2E1および3A5に高い触媒活性が認められた。テガフル1 mMでは、CYP1A2と2A6が特に高い活性を示した。これらの5-FU生成における速度論的解析を行ったところ、 $V_{max}/K_m$ で示される代謝効率はCYP1A2の場合に最も高い値を示した。このことから、組換えP450酵素を用いた検討ではCYP1A2が最も重要であると考えられた。

5-FU生成活性と3種の薬物酸化活性を12例のヒト肝ミクロソームについて調べた結果をFig.2に示した。上段には基質としてテガフル100  $\mu$ M、下段には1 mMでの5-FU生成活性を示した。CYP1A2の指標活性であるフェナセチンO-脱エチル化酵素活性と5-FU生成活性は、どちらの基質濃度においても相関しなかった。CYP2A6の指標活性であるクマリン7-水酸化酵素活性およびCYP2C8の指標活性であるパクリタキセル6 $\alpha$ -水酸化酵素活性と5-FU生成活性には有意な相関が認められた。この相関係数よりテガフル100  $\mu$ Mでは主にCYP2A6、1 mMではCYP2C8の関与が示唆された。

2例のヒト肝ミクロソームの5-FU生成活性に対するP450阻害剤とP450抗体の影響を調べた(Fig.3)。クマリン7-水酸化酵素活性の最も高かったHG3ミクロソームの5-FU生成活性は、CYP2A6の基質であるクマリンとCYP2A6抗体によってのみ強く阻害された。一方、検討した肝ミクロソームのうち5-FU生成活性の最も高かったHG30では、5-FU生成活性がクマリンだけでなく

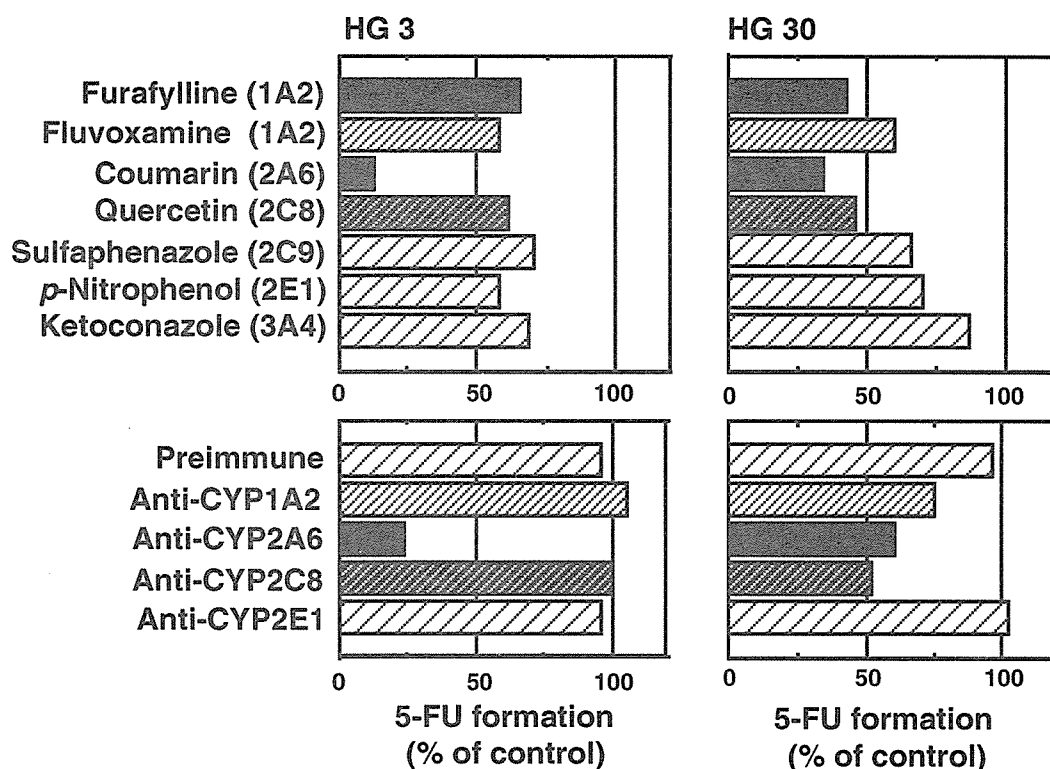


Fig.3. Effects of P450 inhibitors and anti-P450 antibodies on 5-FU formation from tegafur (100  $\mu$ M) by human liver microsomes

CYP1A2 の阻害剤であるフラフィリン、CYP2C8 の阻害剤であるクエルセチンによっても阻害された。また、CYP1A2、2A6 および 2C8 抗体もその 5-FU 生成活性を阻害した。以上のことから、ヒト肝ミクロソームによるテガフルからの 5-FU 生成には CYP1A2、2A6 および 2C8 が主に関与していることが示され、これらの P450 の関与の程度はヒト肝サンプルによって異なることが明らかとなった。

Fig. 4 にフェニトインの予想される代謝経路を示した。フェニトインは主に 4'-水酸化体(5-(4'-hydroxyphenyl)-,5-phenylhydantoin)へ代謝され、その他に 3'-水酸化体、二次代謝物である 3',4'-ジヒドロキシ体(5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-,5-phenylhydantoin)、マイナーな代謝物としてジヒドロジオール体が報告されている。本研究ではフェニトインを基質としてこれらの代謝物の生成活性を調べた。

ヒト肝ミクロソームによるフェニトイン酸化酵素活性を Fig. 5 に示した。基質であるフェニトインはヒトの臨床血中濃度付近である 100  $\mu$ M で用いた。本研究において、ミクロソームタンパクに対し 5 倍量のヒト肝サイトゾルタンパク存在下ではフェニトイン代謝活性が増加することを見出したので、左側のカラムにはサイトゾル非存在下、右側のカラムには個々のサイトゾル存在下での活性を示した。フェニトインからの主代謝物は 4'-水酸化体であり、3'-水酸化体の生成は HL-10 でのみ見られた。サイトゾル存在下でのジヒドロキシ体の生成量はトータルのフェニトイン酸化活性の 10-40% を占めていた。そこで、自己抗体生成の原因となる可能性も示唆されているジヒドロキシ体の生成に焦点を絞って、その生成に関与する P450 の役割を一次代謝物である 4'-水酸化体または 3'-水酸化体を基質として用いて検討した。

大腸菌に発現させた 10 種のヒト P450 酵素のフェニトインまたは一次代謝物の酸化活性を Fig. 6 に示した。フェニトインからの 4'-水酸化体生成は CYP2C9 および CYP2C19 により活性が認められた。4'-水酸化体および 3'-水酸化体からのジヒドロキシ体生成は CYP2C19 により最も高い触媒活性が見られ、その他、CYP3A4 と CYP2C9 により活性が認められた。

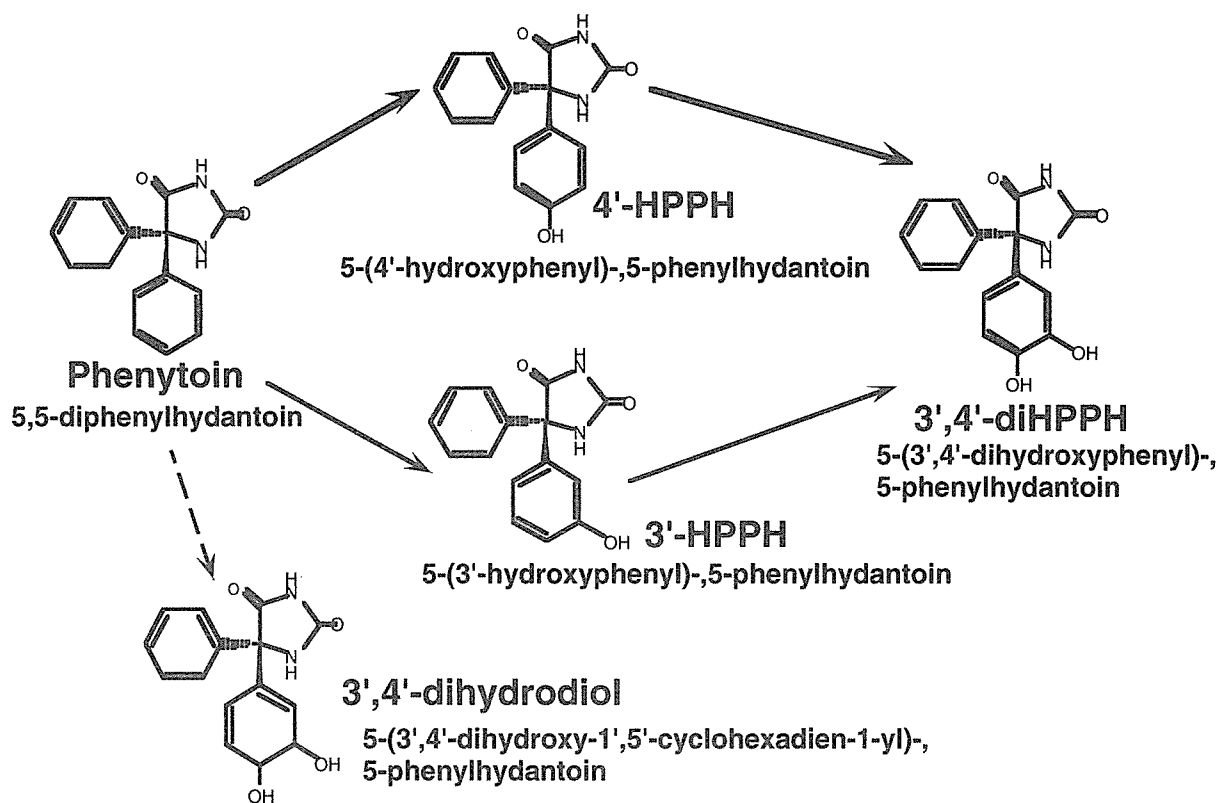


Fig.4. Proposed metabolic pathways of phenytoin

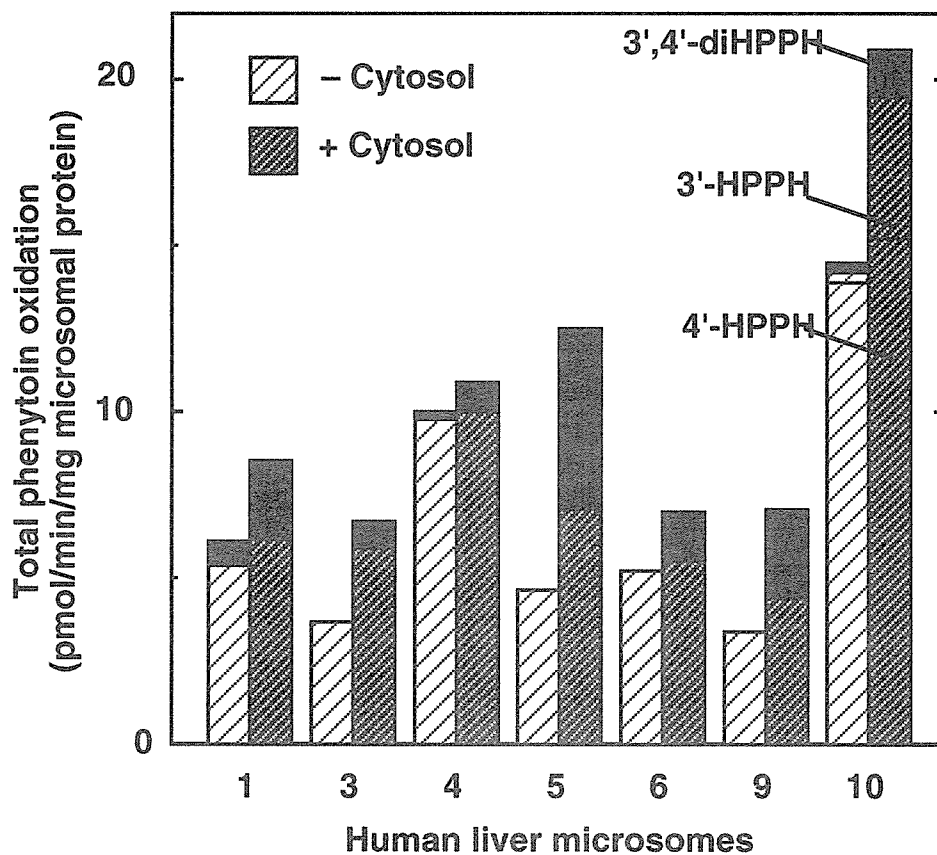


Fig.5. Phenytoin oxidation activities catalyzed by 7 human liver microsomes

4例のヒト肝ミクロソームについて 10  $\mu$ M 4'-水酸化体からのジヒドロキシ体生成に対する P450 阻害剤の影響を Fig.7 に示した。ジヒドロキシ体生成に対する P450 阻害剤の影響はサンプルによって異なっており、CYP3A 含量の高い HL-3 では CYP3A4 の阻害剤であるケトコナゾールにより最も強い阻害が見られ、CYP2C 含量の高い HL-4 では CYP2C19 の阻害剤であるフラボキサミンによって強く阻害された。一方、HL-10 ではフラボキサミン、スルファフェナゾール、ケトコナゾールによる阻害が見られ、HL-1 では検討した阻害剤によっては弱い阻害しか認められなかった。以上のことから、ジヒドロキシ体の生成における CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4 などの複数の P450 の関与が示唆された。

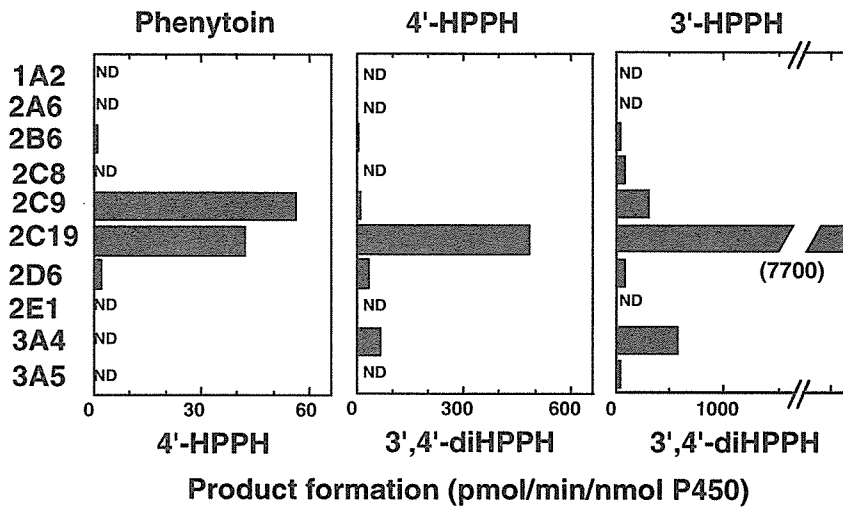


Fig.6. Oxidation of phenytoin, 4'-HPPH or 3'-HPPH by recombinant human P450 enzymes  
Substrates (100  $\mu$ M) were incubated with *E. coli* membranes containing recombinant human P450 enzymes (0.20  $\mu$ M) and NADPH-P450 reductase. ND, not detected (<1 pmol/min/nmol P450 for 4'-HPPH and <5 pmol/min/nmol P450 for 3',4'-diHPPH).

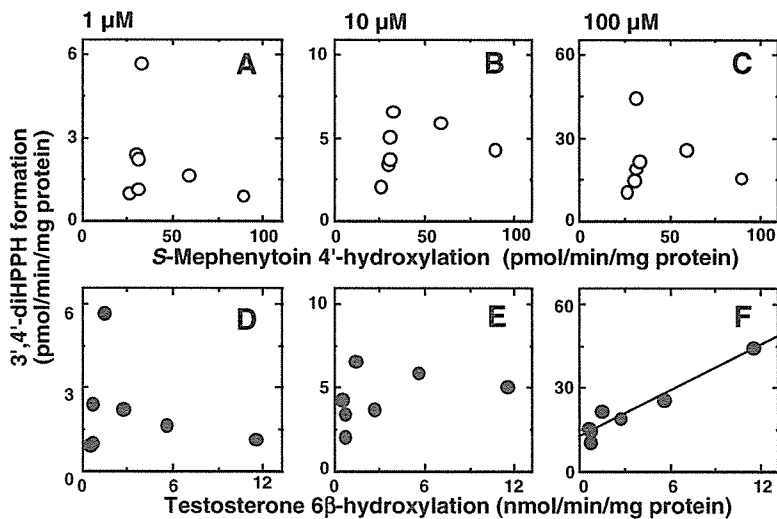


Fig.7. Relationship between 3',4'-diHPPH formation from 4'-HPPH and drug oxidation in 7 human liver microsomes

#### 4. 考 察

様々な含量の P450 をもつヒト肝ミクロソームと組換えヒト P450 酵素を用いて、ヒトにおけるテガフルからの 5-FU 生成には主に CYP1A2、CYP2A6 および CYP2C8 が関与し、これらの P450 の役割はヒト肝サンプルによって異なり、個人差の一因となるという考えを支持するいくつかの結果を得た。第一に、CYP1A2 は特に低い基質濃度におけるテガフルからの 5-FU 生成に関与した。ヒト肝ミクロソームの 5-FU 生成活性はフェナセチン O-脱エチル化酵素活性や CYP1A2 含量と相関しなかったが、組換え CYP1A2 は 5-FU 生成活性に対して高い  $V_{max}/K_m$  値を



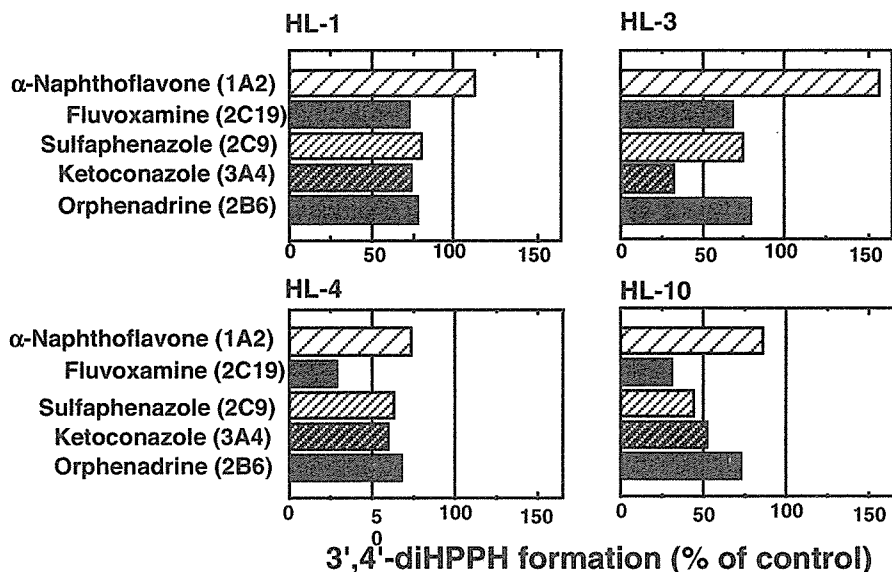


Fig.8. Effects of P450 inhibitors on 3',4'-diHPPH Formation from 4'-HPPH (10  $\mu$ M) by human liver microsomes

示し、抗 CYP1A2 抗体は 5-FU 生成活性の高いサンプルにおいて阻害作用を示した。P450 阻害剤を用いた検討では、フラフィリンとフラボキサミンが同じサンプルにおいて 100  $\mu$ M テガフルールからの 5-FU 生成活性を効果的に阻害した。第二に、ヒト肝マイクロソームのパクリタキセル 6 $\alpha$ -水酸化酵素活性は 5-FU 生成活性と相関し、その相関係数(r)はテガフルール 1 mM において高かった。クエルセチンと抗 CYP2C8 抗体は 2 つの肝マイクロソームの 5-FU 生成活性を異なる程度に阻害した。これらの結果はテガフルールからの 5-FU 生成における CYP2C8 の寄与を示唆している。最後に、CYP2A6 は 5-FU 生成に関与する重要な酵素であることが確認された。組換え CYP2A6 はテガフルール 100  $\mu$ M および 1 mM において高い触媒活性を示した。ヒト肝マイクロソームの 5-FU 生成活性は、クマリン 7-水酸化酵素活性および CYP2A6 含量と有意に相関した。さらに、クマリンと抗 CYP2A6 抗体は、ヒト肝マイクロソームの 5-FU 生成活性を効果的に阻害した。組換え CYP2A6 の  $K_m$  値は、HG3 ミクロソームの  $K_m$  値とほぼ同じであった。本研究ではヒト肝 P450 がテガフルールから 5-FU 生成への代謝的活性化を触媒していることを明らかにした。ヒト肝において、定常血中濃度 (100  $\mu$ M) 付近のテガフルールからの 5-FU 生成は主にマイクロソーム画分の酵素 (P450) によって触媒され、テガフルール濃度が高い場合にはサイトゾル画分のチミジンホスホリラーゼにより触媒されることも明らかにした。

ヒト肝マイクロソームによるフェニトイン酸化酵素活性は肝サイトゾルの添加によって増加し、サイトゾル存在下の 3',4'-diHPPH 生成活性は主代謝物である 4'-HPPH 生成活性と同レベルであった。4'-HPPH 生成には主に CYP2C9、一部 CYP2C19 が関与した。一方、3',4'-diHPPH 生成には主に CYP2C9、CYP2C19 および CYP3A4 が関与しており、これらの P450 の寄与の程度はヒト肝 P450 の組成比に依存して個人差が認められることを明らかにした。ヒト肝マイクロソームのフェニトイン代謝研究は、個々の肝サイトゾル存在下で行わなければならないことを提唱した。サイトゾル存在下の 3',4'-diHPPH 生成活性は、主代謝物である 4'-HPPH 生成活性と同レベルであり、一次代謝物からの 3',4'-diHPPH 生成には CYP2C9、CYP2C19 および CYP3A4 が関与していることが明らかとなった。さらに、これらの P450 分子種の関与はヒト肝サンプルによって異なり、P450 分子種の含量の個人差が主に代謝に関与する P450 分子種を決定している可能性が示された。

## 5. まとめ

フェニトインとテガフルールの薬物相互機序に関して、テガフルールからの 5-FU 生成およびフェニトインの代謝に主に関与するヒト肝 P450 分子種は異なることが明らかとなり、これらの薬物相互作用がテガフルールによる P450 を介したフェニトイン代謝の直接的な阻害によるものではな

いことを明らかにした。今後両薬物の酵素誘導と代謝酵素活性の関係を追求する必要がある。ヒト組換え P450 酵素の十分な触媒活性をもとに、ヒト肝での代謝を予測する方法について、十分に検討した組換え P450 の触媒活性に、免疫化学的に求めた各 P450 分子種含量を発現系の反応速度パラメータに乗じる方法と、ヒト肝ミクロソームとヒト P450 発現系と典型的な薬物酸化反応との相対比から各 P450 分子種含量を推定する方法が考案されている。ヒト肝ミクロソームと組換え P450 を組み合わせることで、さらに他の医薬品の代謝に関する十分な検討を進める予定である。

## 6. 研究発表

1. Komatsu, T., Yamazaki, H., Asahi, S., Gillam, E.M.J., Guengerich, F.P., Nakajima, M., and Yokoi, T. Formation of a dihydroxy metabolite of phenytoin by human liver microsomes/cytosol: roles of cytochrome P450 2C9, 2C19, and 3A4. *Drug Metab. Dispos.*, 28: 1361-1368, 2000.

2. Komatsu, T., Yamazaki, H., Shimada, N., Nakajima, M., and Yokoi, T. Roles of cytochrome P450 1A2, 2A6, and 2C8 in 5-fluorouracil formation from tegafur, an anti-cancer prodrug, in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, 28: 1457-1463, 2000.

3. Ohyama, K., Nakajima, M., Suzuki, M., Shimada, N., Yamazaki, H., and Yokoi, T. Inhibitory effects of amiodarone and its N-deethylated metabolite on human cytochrome P450 activities: Prediction of in vivo drug interactions. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 49: 244-253, 2000.

4. Ohyama, K., Nakajima, M., Nakamura, S., Shimada, N., Yamazaki, H., and Yokoi, T. A significant role of human cytochrome P450 (CYP) 2C8 in amiodarone and N-deethylation: an approach to predict the contribution with reactive activity factor (RAF). *Drug Metab. Dispos.*, 28: 1303-1310, 2000.

5. Yamazaki, H., Suzuki, M., Tane, K., Shimada, N., Nakajima, M., and Yokoi, T. In vitro inhibitory effects of troglitazone and its metabolites on drug oxidation activities of human cytochrome P450 enzymes: comparison with pioglitazone and rosiglitazone. *Xenobiotica*, 30: 61-70, 2000.

6. Yamazaki, H., Hatanaka, N., Kizu, R., Hayakawa, K., Shimada, N., Guengerich, F.P., Nakajima, M., and Yokoi, T. Bioactivation of diesel exhaust particles extracts and their major nitrated polycyclic aromatic hydrocarbon components, 1-nitropyrene and dinitropyrenes, by human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1. *Mutat. Res.*, 472: 129-138, 2000.

7. Yamazaki, H. Roles of human cytochrome P450 enzymes involved in drug metabolism and toxicological studies. *J. Pharm. Soc. J.*, 120: 1347-1357, 2000.

8. Emoto, C., Yamazaki, H., Iketaki, H., Yamasaki, S., Satoh, T., Shimizu, R., Suzuki, S., Shimada, N., Nakajima, M., and Yokoi, T. Cooperativity of a-naphthoflavone in cytochrome P450 3A-dependent drug oxidation activities in hepatic and intestinal microsomes from mice and humans. *Xenobiotica*, in press.

9. Shimada, T., Tsumura, F., Yamazaki, H., Guengerich, F.P., and Inoue, K. Characterization of ( $\pm$ )-bufuralol 1'-hydroxylation activities in liver microsomes of Japanese and Caucasian subjects genotyped for CYP2D6 gene. *Pharmacogenetics*, in press.

10. Komatsu, T., Yamazaki, H., Shimada, N., Nagayama, S., Kawaguchi, Y., Nakajima, M., and Yokoi, T. Involvement of microsomal cytochrome P450 and cytosolic thymidine phosphorylase in 5-fluorouracil formation from tegafur in human liver. *Clin. Cancer Res.*, in press.

---

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社