

Fig. 9. Inhibitory effects of eserine and BNPP on PNPA hydrolase activities by recombinant human AADAC, CES1, and CES2 determined at the substrate concentration of 500  $\mu$ M. The concentrations of inhibitors were 10  $\mu$ M. The control activities by recombinant AADAC, CES1, and CES2 were 722.6 nmol/min/mg, 709.4 nmol/min/mg, and 443.0 nmol/min/mg, respectively. Each column represents the mean of duplicate determinations.

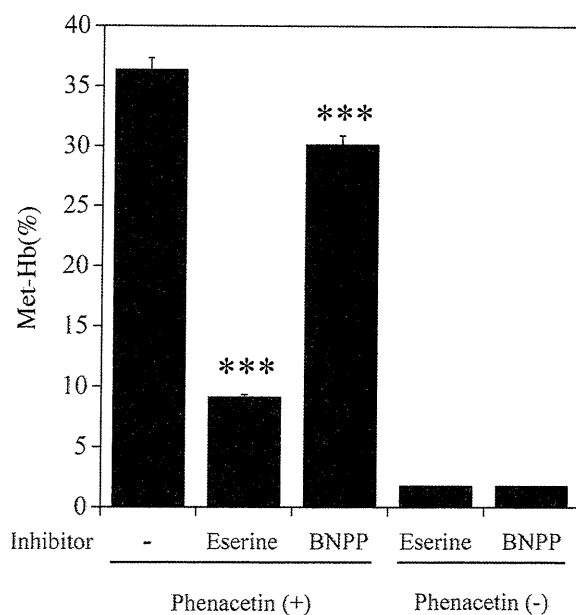


Fig. 10. Inhibitory effects of eserine and BNPP on phenacetin-induced methemoglobinemia. HLM (1.0 mg/mL) were incubated with 5 mM phenacetin, 10  $\mu$ M eserine or 10  $\mu$ M BNPP, an NADPH-generating system, and mouse red blood cells. Each column represents the mean  $\pm$  SD of triplicate determinations. \*\*\*  $P < 0.001$  compared with no inhibitor.

#### D. 考察

解熱鎮痛薬であるフェナセチンは腎盂腎炎や腎細胞がんといった重篤な副作用のために 2001 年に販売中止となった (Sicardi et al., 1991; Gago-Dominguez et al., 1999)。また、フェナセチンには腎毒性の他に Met-Hb 血症などの副作用が知られている (Jensen and Jollow, 1991)。Met-Hb の投与により腎機能障害が生じることが報告されており (Jaenike, 1969)、Met-Hb 血症を誘発する化合物は腎機能障害を引き起こす可能性が考えられる。フェナセチンは約 70–80% が主に CYP1A2 により薬理活性を有する代謝物である APAP に代謝される。この反応とは別に加水分解により *p*-フェネチジンが生成し (Butler et al., 1989; Kudo et al., 2000)、さらに *N* 位が水酸化された *N* 位水酸化フェネチジンが毒性発現に関与すると考えられているが、実際に毒性発現に対する代謝物の関与は明らかにされていない。

これまでにフェナセチンの Met-Hb 血症誘発には加水分解代謝経路の関与が示唆されており (Büch et al., 1969)、当研究室の最近の研究でヒトでは AADAC がフェナセチンの加水分解反応を担う主な酵素であることを明らかにした (Watanabe et al., 2010)。しかし、これらの代謝過程に関与する酵素が毒性発現に重要であるか未だに明らかにされていないため、本研究では、フェナセチンの Met-Hb 血症に関与する酵素の重要性を明らかにすることを目的とした。

マウス組織におけるフェナセチンの加

水分解反応はヒトと同様に、AADAC が主に触媒していることが示唆されており、MLM におけるフェナセチン加水分解酵素活性が RLM よりも高値を示したことから今回の *in vivo* における検討ではマウスを選択した。

フェナセチンを経口投与したマウスで Met-Hb 濃度の上昇が認められ、フェナセチンおよび代謝物の血漿中濃度を測定したところ、投与 1 時間後で Met-Hb 濃度が最大値を示し、代謝物である *p*-フェネチジンおよび APAP 濃度は 15 分から 1 時間後で高値を示した (Fig. 2)。加水分解酵素阻害剤である TOTP を前投与したマウスにフェナセチンを投与することで血漿中 *p*-フェネチジン濃度の減少が認められるとともに Met-Hb 濃度の減少も認められた (Figs. 14A and C)。TOTP の単回投与により MLM におけるフェナセチン加水分解酵素活性の減少が認められた一方、脱エチル化酵素活性には影響は認められなかった (Fig. 4)。TOTP を前投与することにより、マウス肝臓においてフェナセチンの加水分解が阻害された結果、*p*-フェネチジン生成速度が低下し、ヘモグロビンから Met-Hb への変換率が低下したと考えられる。以上の *in vivo* における検討より、フェナセチン投与における Met-Hb 血症発現にはフェナセチンの加水分解代謝経路が関与していることが示された。

薬物代謝酵素には質的および量的な差異が存在するため、ヒトにおけるフェナセチン誘導性 Met-Hb 血症に関与する酵素の同定には *in vitro* におけるヒトに外挿

できる検討が必要である。フェナセチン、*p*-フェネチジンおよび APAP を HLM、NADPH 生成系およびマウス由来の赤血球とインキュベートし、赤血球中のヘモグロビンが Met-Hb に変換される量を検討したところ、フェナセチン (0.1、1、5 mM) および *p*-フェネチジン (0.01、0.1、1 mM) 処置群において濃度依存的な Met-Hb 濃度の上昇が認められ、APAP (0.01、0.1、1 mM) においては Met-Hb 濃度の上昇は認められなかった (Fig. 6)。このことからフェナセチンの脱エチル化に付随する代謝経路は Met-Hb 生成に関与しないことが示された。また、*p*-フェネチジンにおいてフェナセチンより低濃度から Met-Hb 濃度の上昇が認められていることより、フェナセチンの加水分解反応が毒性発現に関与していることが示唆された。さらに、予備検討においてフェナセチンおよび *p*-フェネチジンを HLM 非存在下で赤血球とインキュベートしても Met-Hb 濃度の上昇は認められなかったことより (data not shown)、フェナセチンおよび *p*-フェネチジン自体は Met-Hb 生成に関与せず、*p*-フェネチジンの代謝産物がヘモグロビンを Met-Hb に変換することが明らかになった。

次に、フェナセチンの加水分解に次ぐ代謝反応を触媒する酵素の検討を行った。予備検討において、*p*-フェネチジンを NADPH 生成系非存在下で HLM および赤血球と反応させたところ、Met-Hb 濃度の変動は全く認められなかったことより (data not shown)、NADPH 依存的に触媒活性を示す薬物代謝酵素である CYP の寄与

が高いことが考えられた。そこで、酵素源に各種 CYP 発現系を用いて *p*-フェネチジンと赤血球をインキュベートした。結果、CYP1A2 ( $65.0 \pm 1.8\%$ )、CYP2C19 ( $3.6 \pm 0.3\%$ )、CYP2D6 ( $4.8 \pm 0.4\%$ ) および CYP2E1 ( $25.2 \pm 0.6\%$ ) において有意に高い Met-Hb 濃度が認められ、特に CYP1A2 および CYP2E1 で高い値が認められた (Fig. 7)。CYP1A2 および CYP2E1 のヒト肝臓における発現量はそれぞれ全 CYP 含量の 8.0% および 9.0% を占め、CYP2C19 (4.0%) および CYP2D6 (2.0%) に比べ高いことから (Rodrigues, 1999)、CYP1A2 および CYP2E1 が *p*-フェネチジン代謝を担い毒性発現に関与していると考えられた。

AADAC はフェナセチンの主要な加水分解酵素であるが (Watanabe et al., 2010)、実際に毒性発現に関与しているか明らかになっていない。そこで加水分解酵素である AADAC、CES1、CES2 と CYP1A2、CYP2E1 の発現系を組み合わせるフェナセチンの毒性発現を検討したところ、AADAC と CYP1A2 もしくは CYP2E1 の併用群において顕著に高い Met-Hb 濃度が認められ (Fig. 8)、AADAC による加水分解反応がフェナセチン誘導性 Met-Hb 血症発現に関与することが示唆された。また、*p*-フェネチジンを基質とした際には CYP1A2 により CYP2E1 よりも Met-Hb 濃度は高値を示したが (Fig. 7)、フェナセチンを基質とし AADAC と CYP1A2 または CYP2E1 を併用した際には、CYP2E1 との併用群の方が高い Met-Hb 濃度を示した (Fig. 8)。この原因として CYP1A2 はフェ

ナセチンを効率的に APAP に代謝するため、CYP1A2 との併用群では *p*-フェネチジンの生成量が CYP2E1 との併用群よりも低いことが考えられた。また、CYP1A2 単独群においても Met-Hb 濃度の上昇が認められた (Fig. 8)。フェナセチンは CYP1A2 により APAP に代謝されることが知られているが、前述の検討で APAP は Met-Hb 血症を示さないことが明らかになっている (Fig. 6)。Met-Hb 濃度の上昇の原因として、フェナセチンがインキュベート中に自然分解され生成した *p*-フェネチジンが CYP1A2 により代謝されたことが考えられた。

CES1 と CYP1A2 併用群においても CYP1A2 単独群に比べ軽微ではあるが Met-Hb 濃度の上昇が認められており (Fig. 8)、さらにヒト肝臓における CES1 の発現量は AADAC よりも高いことから、CES1 がフェナセチンの毒性発現に関与する可能性は否定できない。そこで AADAC および CES それぞれに強力に働く阻害剤を用いて阻害実験を行った。AADAC の強力な阻害剤である 10  $\mu$ M エセリンはフェナセチン誘発性の Met-Hb 生成効率を顕著に減少させたが、CES の強力な阻害剤である 10  $\mu$ M BNPP では有意であったものの減少の程度は軽微であった (Fig. 10)。10  $\mu$ M エセリンは AADAC、CES1 および CES2 の PNPA 加水分解酵素活性をそれぞれ 93.2%、2.5% および 91.4% 阻害したが (Fig. 9)、エセリン処置群において、AADAC の酵素活性がほぼ阻害されているにも関わらずフェナセチン未添加 ( $1.7 \pm 0.0\%$ ) に比べフェナセチンを添加

( $9.1 \pm 0.3\%$ ) することで軽微な Met-Hb 濃度の上昇が認められた (Fig. 10)。この原因として、前述したようにフェナセチンがインキュベート中に自然分解し、*p*-フェネチジンが生成しているためであると考えられた。また、エセリンは肝臓および血漿中に発現するブチリルコリンエステラーゼに対しても強力な阻害効果を有するが (Jbilo et al., 1994; Li et al., 2005)、当研究室の過去の検討で血漿においてフェナセチン加水分解酵素活性は認められていない (Watanabe et al., 2010)。以上の結果よりフェナセチン誘導性 Met-Hb 血症の発現には AADAC による加水分解とそれに続く CYP1A2 および CYP2E1 による水酸化反応が大きく寄与していることが考えられた。

Peters ら (1999) の報告では、CYP1A2 をノックアウトしたマウスでは野生型マウスに比べ、フェナセチン投与により腎線維化などの毒性の増加が認められており、CYP1A2 はフェナセチンを APAP に変換することで解毒代謝の役割を担うことが考えられる。しかし、今回の検討において CYP1A2 発現系によりフェナセチン誘導性 Met-Hb 血症への関与が示唆されたことから (Figs. 16 and 17)、CYP1A2 は APAP 生成によるフェナセチンの解毒代謝経路、および *N* 位水酸化フェネチジン生成による毒性発現代謝経路の両者に関与していることが考えられた。一方で、CYP2E1 は Met-Hb 生成に関与するだけでなく、APAP から肝毒性を有する *N*-アセチル-*p*-ベンゾキノニンイミン (NAPQI) への代謝反応も主に担うことから (Sarich

et al., 1997; Manyike et al., 2000)、フェナセチンにおける毒性発現に重要な役割を担っていると考えられる。

今回の検討で用いた赤血球サンプルはマウス由来であり、ヒト由来の赤血球を用いた検討は行っていない。Smith (1986) により、Met-Hb をヘモグロビンに還元する NADH-依存性メトヘモグロビン還元酵素ジアホラーゼの酵素活性がラットおよびマウス赤血球中ではヒト赤血球中よりそれぞれ 5 および 10 倍高いことが報告されており、ヒトでは Met-Hb に対する感受性が高いことが示唆されている。実際に、ヒトはげっ歯類に比べフェナセチンによる Met-Hb 生成率が高いことが知られており (Lester, 1943)、ヒト赤血球を用いて検討を行った際にも同様にフェナセチン処置により高い Met-Hb 濃度が認められると考えられる。現在倫理委員会の承認を得たので、ヒトの血液を用いた検討を予定している。

Met-Hb 血症を誘発すると考えられている化合物にはフェナセチンの他に、局所麻酔薬であるベンゾカイン、ハンセン病治療薬であるダブソン、抗生物質であるスルファメトキサゾールなどが知られており (Guertler and Pearce, 1994; Vage et al., 1994; Reilly et al., 1999)、これらは全て芳香族アミンに属する。これらの化合物はフェナセチンと同様、*N*位水酸化反応により Met-Hb 血症を誘発すると考えられており、芳香族アミンと Met-Hb 生成には強い関連があることが示唆されている。フェナセチンと同様に、AADAC の基質であるフルタミドにおいても Met-Hb 血症

を誘発することが示唆されており (Khan et al., 1997)、フルタミドの加水分解反応により生成した FLU-1 が *N*位水酸化された代謝物が原因であると考えられる。このように、AADAC が触媒する加水分解反応は芳香族アミンを生成する可能性があり、AADAC により加水分解される医薬品が新たに開発された場合、Met-Hb 血症に対して注意を払わなければならない。

CYP に関しては、エタノールにより CYP2E1 が誘導されることで解熱鎮痛薬である APAP を投与した際に、肝毒性を有する NAPQI への代謝が促進されることや (Tolman, 1998)、CYP1A2 阻害作用を有する抗生物質であるシプロフロキサシンにより、筋弛緩薬のチザニジンの血中濃度曲線下面積 (AUC) を約 10 倍上昇させるため、チザニジンの副作用を増強することが示唆されている (Granfors et al., 2004)。このように CYP に関する誘導や阻害に関する検討は多数報告されている。しかし、AADAC の誘導や阻害に関する検討はほとんどなされていないため、AADAC の薬物相互作用の検討を行うことが必要であると考えられる。

## E. 結論

本研究ではフェナセチン誘導性 Met-Hb 血症には加水分解反応とそれに続く水酸化反応が関与していることを示し、これらの反応に AADAC、CYP1A2 および CYP2E1 の寄与が高いことを明らかにした。本研究は AADAC が毒性発現に関与することを初めて明らかにしており、AADAC が薬物代謝における重要性を示

す新たな情報を提供することが出来た。

#### <参考論文>

- Büch H, Buzello W, Heymann E and Krisch K (1969) Inhibition of phenacetin- and acetanilide-induced methemoglobinemia in the rat by the carboxylesterase inhibitor bis-[*p*-nitrophenyl] phosphate. *Biochem Pharmacol* **18**: 801-811.
- Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP and Kadlubar FF (1989) Human cytochrome P-450PA (P-450IA2), the phenacetin *O*-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and *N*-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 7696-7700.
- Gago-Dominguez M, Yuan JM, Castela JE, Ross RK and Yu MC (1999) Regular use of analgesics is a risk factor for renal cell carcinoma. *Br J Cancer* **81**: 542-548.
- Granfors MT, Backman JT, Neuvonen M and Neuvonen PJ (2004) Ciprofloxacin greatly increases concentrations and hypotensive effect of tizanidine by inhibiting its cytochrome P450 1A2-mediated presystemic metabolism. *Clin Pharmacol Ther* **76**: 598-606.
- Guertler AT and Pearce WA (1994) A prospective evaluation of benzocaine-associated methemoglobinemia in human beings. *Ann Emerg Med* **24**: 626-630.
- Hioki T, Fukami T, Nakajima M and Yokoi T (2011) Human paraoxonase 1 is the enzyme responsible for pilocarpine hydrolysis. *Drug Metab Dispos* **39**: 1345-1352.
- Humerickhouse R, Lohrbach K, Li L, Bosron WF and Dolan ME (2000) Characterization of CPT-11 hydrolysis by human liver carboxylesterase isoforms hCE-1 and hCE-2. *Cancer Res* **60**: 1189-1192.
- Jensen CB and Jollow DJ (1991) The role of *N*-hydroxyphenetidine in phenacetin-induced hemolytic anemia. *Toxicol Appl Pharmacol* **111**: 1-12.
- Jaenike JR (1969) Micropuncture study of methemoglobin-induced acute renal failure in the rat. *J Lab Clin Med* **73**: 459-468.
- Khan AM, Singh NT and Bilgrami S (1997) Flutamide induced methemoglobinemia. *J Urol* **157**: 1363.
- Kudo S, Umehara K, Hosokawa M, Miyamoto G, Chiba K and Satoh T (2000) Phenacetin deacetylase activity in human liver microsomes: distribution, kinetics, and chemical inhibition and stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* **294**: 80-88.
- Lester D (1943) Formation of methemoglobin I. Species differences with acetanilide and acetophenetidine. *J Pharmacol Exp Ther* **77**: 154-159.
- Manyike PT, Kharasch ED, Kalhorn TF and Slattery JT (2000) Contribution of CYP2E1 and CYP3A to acetaminophen reactive metabolite formation. *Clin Pharmacol Ther* **67**: 275-282.
- McLean S (1978) Metabolism of phenacetin and *N*-hydroxyphenacetin in isolated rat hepatocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **305**: 173-180.
- Nakajima A, Fukami T, Kobayashi Y, Watanabe A, Nakajima M and Yokoi T (2011) Human arylacetamide deacetylase is responsible for deacetylation of rifamycins: rifampicin, rifabutin, and rifapentine. *Biochem Pharmacol* **82**: 1747-1756.
- Nakayama N and Masuda Y (1985) Suppression of phenacetin-induced methemoglobinemia by diethyldithiocarbamate and carbon disulfide and its relation to phenacetin metabolism in mice. *J Pharmacobiodyn* **8**: 868-876.
- Nyberg L, Rosenborg J, Weibull E, Jönsson S, Kennedy BM and Nilsson M (1998) Pharmacokinetics of bambuterol in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* **45**: 471-478.
- Peters JM, Morishima H, Ward JM, Coakley CJ, Kimura S and Gonzalez FJ (1999) Role of CYP1A2 in the toxicity of long-term phenacetin feeding in mice. *Toxicol Sci* **50**: 82-89.
- Probst MR, Beer M, Beer D, Jenö P, Meyer UA and Gasser R (1994) Human liver arylacetamide deacetylase. Molecular cloning of a novel esterase involved in the metabolic activation of arylamine carcinogens with high sequence similarity to hormone-sensitive lipase. *J Biol Chem* **269**: 21650-21656.
- Probst MR, Jenö P and Meyer UA (1991) Purification and characterization of a human liver arylacetamide deacetylase. *Biochem Biophys Res Commun* **177**: 453-459.
- Reilly TP, Woster PM and Svensson CK (1999) Methemoglobin formation by hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone: implications for differences in adverse drug reactions. *J Pharmacol Exp Ther* **288**: 951-959.
- Rodrigues AD (1999) Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping: attempting to bridge the gap between cDNA-expressed cytochromes P450 and native human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **57**: 465-480.
- Sarich T, Kalhorn T, Magee S, al-Sayegh F, Adams S, Slattery J, Goldstein J, Nelson S and Wright J (1997) The effect of omeprazole pretreatment on acetaminophen metabolism in rapid and slow metabolizers of *S*-mephenytoin. *Clin Pharmacol Ther* **62**: 21-28.
- Sicardi SM, Martiarena JL and Iglesias MT (1991) Mutagenic and analgesic activities of

aniline derivatives. *J Pharm Sci* **80**: 761-764.

Smith RP (1986) Toxic responses of the blood. In: Klaassen CD, Amdur MO, Doull J, eds. *Casarett & Doull's toxicology — The basic science of poisons*, 3rd ed. New York, Macmillan, pp. 223-244.

Tiwari R, Koffel R and Schneiter R (2007) An acetylation/deacetylation cycle controls the export of sterols and steroids from *S. cerevisiae*. *EMBO J* **26**: 5109–5119.

Vage C, Saab N, Woster PM and Svensson CK (1994) Dapsone-induced hematologic toxicity: comparison of the methemoglobin-forming ability of hydroxylamine metabolites of dapsone in rat and human blood. *Toxicol Appl Pharmacol* **129**: 309-316.

Wang J, Sun B, Cao Y and Tian Y (2009) Protection of wheat bran feruloyl oligosaccharides against free radical-induced oxidative damage in normal human erythrocytes. *Food Chem Toxicol* **47**: 1591-1599.

Watanabe A, Fukami T, Nakajima M, Takamiya M, Aoki Y and Yokoi T (2009) Human arylacetamide deacetylase is a principal enzyme in flutamide hydrolysis. *Drug Metab Dispos* **37**: 1513-1520.

Watanabe A, Fukami T, Takahashi S, Kobayashi Y, Nakagawa N, Nakajima M and Yokoi T (2010) Arylacetamide deacetylase is a determinant enzyme for the difference in hydrolase activities of phenacetin and acetaminophen. *Drug Metab Dispos* **38**: 1532-1537.

Wirth PJ, Alewood P, Calder I and Thorgeirsson SS (1982) Mutagenicity of *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene and *N*-hydroxy-phenacetin and their respective deacetylated metabolites in nitroreductase deficient *Salmonella* TA98FR and TA100FR. *Carcinogenesis* **3**: 167-170.

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1.論文発表

投稿準備中

## 2.学会発表

小林祐喜、深見達基、中島美紀、横井毅：フェナセチン誘導性メトヘモグロビン血症における arylacetamide deacetylase (AADAC)および CYP1A2、CYP2E1 の関与 日本薬学会第 132 年会 2012.3.28-31 口頭 札幌

小林祐喜、深見達基、樋口良太、中島美紀、横井毅：フェナセチンによるメトヘモグロビン血症におけるアリルアセタミドデアセチラーゼの関与 第 39 回日本毒性学会学術年会 2012.7.17-19 ポスター 仙台

## H. 知的財産権の出願・登録

該当なし。

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表



## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
横井 毅	第II相代謝の評価と創薬	岩尾洋、奥山茂、飯野正光、斉藤亜紀、赤池昭紀、山田久陽	実験薬理学「創薬研究のストラテジー上」	金芳堂	東京	2011	224-231

## 総説

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tsuyoshi Yokoi and Miki Nakajima	Toxicological implications of modulation of gene expression by microRNAs.	Toxicological Sciences	123	1-14	2011
Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi	MicroRNAs from biology to future pharmacotherapy: regulation of cytochrome P450s and nuclear receptors.	Pharmacology & Therapeutics	131	330-337	2011
中島 美紀	シトクロムP450と転写因子のmicroRNAによる発現制御	薬学雑誌	132	107-116	2012

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Katsuhiko Mizuno, Yasuyuki Toyoda, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi	Stimulation of pro-inflammatory responses by mebendazole in human monocytic THP-1 cells through an ERK signaling pathway.	<i>Archives of Toxicology</i>	85	199-207	2011
Toshihisa Koga, Rhoichi Fujiwara, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi.	Toxicological evaluation of acyl glucuronides of NSAIDs using HEK293 cells stably expressing human UGT and human hepatocytes.	<i>Drug Metabolism and Disposition</i>	39	54-60	2011
Satonori Higuchi, Masanori Kobayashi, Yukitaka Yoshikawa, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi.	IL-4 mediated dicloxacillin-induced liver injury in mice.	<i>Toxicological Letters</i>	200	139-145	2011

Yuko Abe, Ryoichi Fujiwara, Shingo Oda, Tsuyoshi Yokoi, and Miki Nakajima	Interpretation for the effects of protein kinase C inhibitors on human UDP-glucuronosyl transferase 1A (UGT1A) proteins in cellulo.	<i>Drug Metabolism and Pharmacokinetics</i>	26	256-265	2011
Atsushi Iwamura, Tatsuki Fukami, Hiroko Hosomi, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi.	CYP2C9-mediated metabolic activation of losartan detected by a high sensitive cell-based screening assay.	<i>Drug Metabolism and Disposition</i>	39	838-846	2011
Yasuyuki Toyoda, Taishi Miyashita, Shinya Endo, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima and Tsuyoshi Yokoi.	Estradiol and progesterone modulate halothane-induced liver injury in mice.	<i>Toxicological Letters</i>	204	17-24	2011
Toru Usui, Takanori Hashizume, Takashi Katsumata, Tsuyoshi Yokoi, and Setsuko Komuro	In vivo investigation of the glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes as risk factors for troglitazone-induced liver injury.	<i>Drug Metabolism and Disposition</i>	39	1303-1310	2011
Hiroko Hosomi, Tatsuki Fukami, Atsushi Iwamura, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi	Development of a highly sensitive cytotoxicity assay system for CYP3A4-mediated metabolic activation.	<i>Drug Metabolism and Disposition</i>	39	1388-1395	2011
Shingo Oda, Miki Nakajima, Yasuyuki Toyoda, Tatsuki Fukami, and Tsuyoshi Yokoi	Progesterone receptor membrane component 1 modulates human cytochrome P450 activities in an isoform-dependent manner.	<i>Drug Metabolism and Disposition</i>	39	2057-2065	2011
Yasuyuki Toyoda, Shinya Endo, Koichi Tsuneyama, Taishi Miyashita, Azusa Yano, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi	Mechanism of exacerbative effect of progesterone on drug-induced liver injury.	<i>Toxicological Sciences</i>	126	16-27	2012
Azusa Yano, Satonori Higuchi, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi.	Involvement of immune-related factors in diclofenac-induced acute liver injury in mice.	<i>Toxicology</i>	293	107-114	2012
Satonori Higuchi, Masanori Kobayashi, Azusa Yano, Koichi Tsuneyama, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi	Involvement of Th2 cytokines in the mouse model of flutamide-induced acute liver injury.	<i>Journal of Applied Toxicology</i>		in press	2012

Masanori Kobayashi, Satoru Higuchi, Mika Ide, Satomi Nishikawa, Tatsuki Fukami, Miki Nakajima, and Tsuyoshi Yokoi	Th2 cytokine-mediated methimazole-induced acute liver injury in mice.	<i>Journal of  Applied  Toxicology</i>		in press	2012
---	---	--	--	----------	------

## VI. 研究成果の刊行物・別刷

## 7 第II相代謝の評価と創薬

横井 毅 (金沢大学 医薬保健研究域)

### はじめに

創薬の初期段階において薬物動態に起因する問題で開発中止になる事例は、近年著しく減少したと言われている。その理由は第I相薬物代謝酵素、特にCYPを中心とした基礎研究が長足の進展をしたことにあり、創薬初期段階のみならず臨床での副作用発現の回避に至るまで、幅広い貢献をしている。近年、創薬初期段階において、CYPに起因する酵素誘導や阻害の問題を起こす可能性がある化合物はスクリーニングで排除されている。その結果、代謝反応を受け難い化合物や、CYP以外の代謝酵素で触媒される化合物が増加傾向にある。

第II相抱合代謝酵素として、グルクロン酸抱合酵素 (UGT)、硫酸抱合酵素 (SULT)、グルタチオン抱合酵素 (GST)、アセチル抱合酵素 (NAT)、アミノ酸抱合やメチル抱合を触媒する酵素等が知られている。図1には、世界のトップ200の医薬品の主要代謝クリアランス等について示す (1)。全クリアランスのうち代謝が約72%を占め (図1A)、そのうち約70%がCYPであり、次にUGT、エステラーゼ、フラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO)、NAT、モノアミンオキシダーゼ (MAO) の順である。第II相酵素ではUGTが主要代謝酵素 (全体の約15%) であり、次いでNAT (全体の約2%) である (図1B)。その他の第II相代謝酵素の関与は、トップ200の医薬品では報告されていない。また、ヒトでの第II相代謝酵素に起因する相互作用のほとんどにUGTの関与が報告され、抱合代謝全体の約40%をUGTが担っているという報告もある (2)。従って、開発時において最も注意を要する第II相代謝酵素はUGTであり、本稿ではUGTの評価と医薬品開発を中心に述べる。

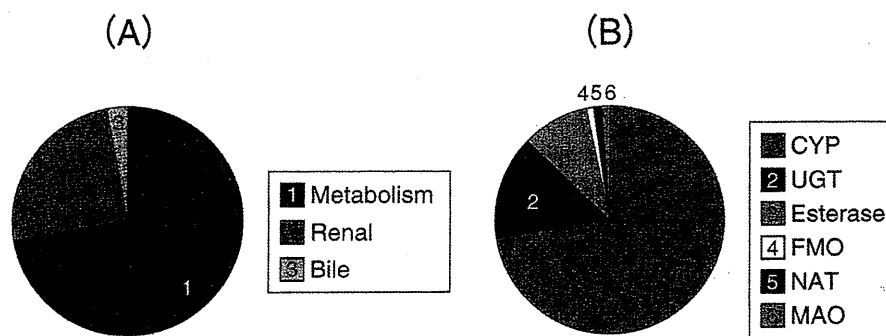


図1 世界のトップ200の医薬品の主要代謝クリアランス (文献1より改変)

## ■ グルクロン酸抱合酵素 (UGT)

UGTは、フェノール基やアルコール基に対してO-グルクロン酸抱合、カルボン酸に対してエステル型グルクロン酸抱合、第1~3級アミンに対してN-グルクロン酸抱合を触媒することが知られている。1種類のUGTが複数の代謝経路を触媒する場合や、1つの代謝経路に複数のUGTが関与する場合も多い。

### (1) ヒト肝および小腸における分子種の存在比

UGTは肝と小腸に高い活性があり、UGTにはUGT1とUGT2ファミリーがあり、UGT1は5つのエクソンから成り、1つの遺伝子から13種類の異なったエクソン1の選択的スプライスによって多くの分子種が発現し、エクソン2~5は同じ配列である。UGT2は6つのエクソンから成る通常の遺伝子構造である。UGTは一般に基質特異性が低いことが知られている。また、UGT1A8およびUGT1A10は小腸に高く発現し、肝では発現していないという特徴的な分子種がある。分子種間で極めて高いアミノ酸配列の相同性を示すために、個々の分子種を分別できる抗体は無い。このために、mRNAレベルでの発現比から推定される。図2Aと2Bは、それぞれ異なる報告におけるヒト肝の分子種の存在比を示す。図2Aは25検体のヒト肝マイクロゾームを(3)、図2Bは3検体でのデータである(4)。プライマーの設定位置や、試料の由来による差異も考えられるが、いずれもUGT2B分子種の割合がかなり高い。また、図2Cにはヒト小腸のデータを示す(4)が、小腸においてもUGT2Bの割合が高いことが示されている。さらに、代表的な薬に対して、複数のUGT分子種の関与についての詳しい報告もなされている(5)。

### (2) UGTの活性測定

UGTは小胞体膜内側に存在しているために、in vitroでの活性測定には補酵素であるUDP-グルクロン酸(UDP-GA: 3~5 mM 添加)や基質との反応性を上げる為に、小胞体膜に穴を開ける試薬であるアラメチシン(30~50  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein 添加)を加える必要がある。酵素源としては、市販品であるヒト肝マイクロソーム、各分子種発現系酵素またはヒトヘパトサイトを用いる。ヘパトサイトには補酵素を加える必要はないが、極めて高価であるた

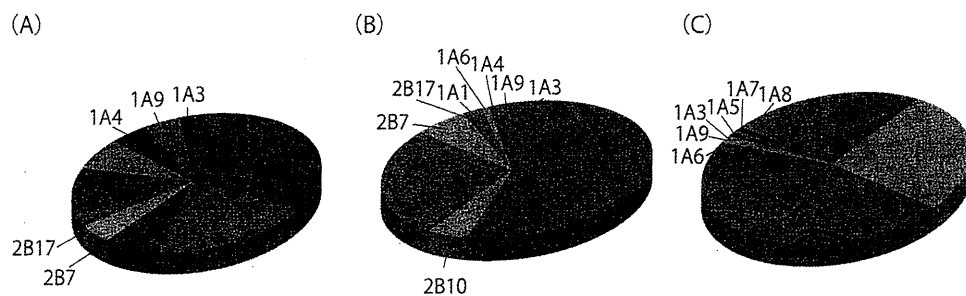


図2 ヒト肝および小腸におけるUGT分子種の存在比

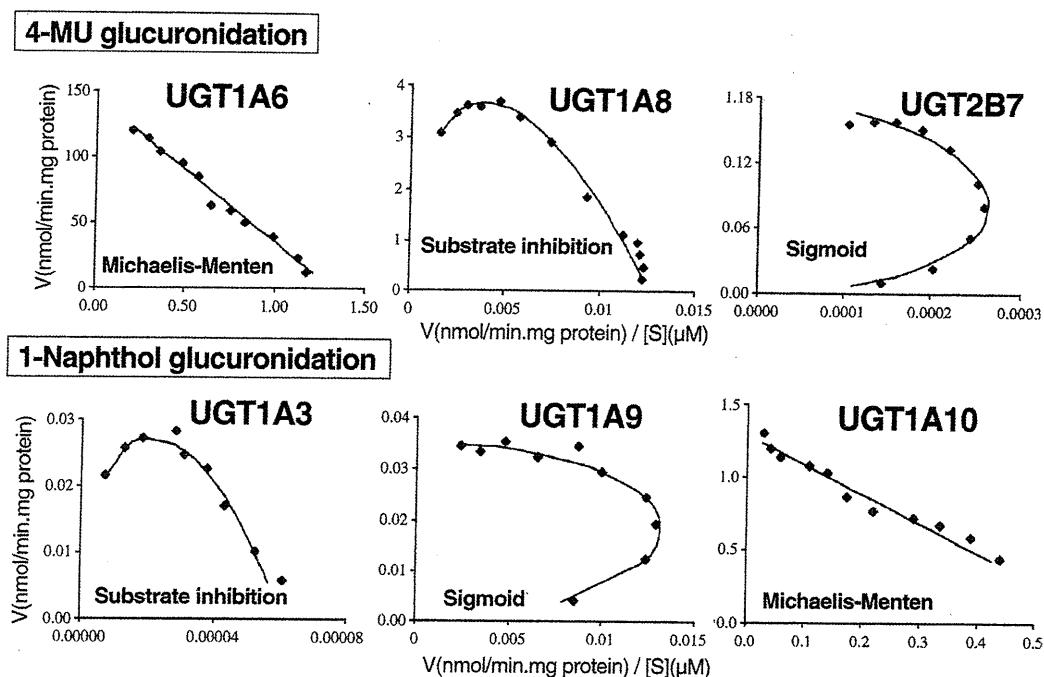


図3 UGT分子種発現系による4-MUと1-ナフトールのグルクロン酸抱合反応のEadie-Hofsteeプロット(文献7より改変)

めに使用が限られる傾向にある。固有クリアランスの算出には、基質の減少で測定する方法もあるが、様々な理由から推奨できない。とりわけ阻害試験には必ず代謝物を指標として検討する必要がある。しかし、多くの場合には代謝物が市販されていないために、グルクロン酸結合を切る酵素である $\beta$ グルクロナダーゼ処理後、HPLC等を用いて標品を精製して定量に供する必要がある。

In vitroでの試験結果からin vivoクリアランスを予測することは、CYPの場合よりもかなり困難である。In vitroではアラメチシンを必要とするほど基質と酵素の反応性が悪いために、予測値はin vivoの実測値をはるかに下回ることが多い。肝ミクロソームでは、 $K_m$ 値が10倍以上高いこともある。従って、よりin vivoに近い値を得られるヒトヘパトサイトの使用が推奨されるが、大きな個人差の影響を考慮する必要がある。ミクロソームの反応系に2%のウシ血清アルブミンを添加すると改善される場合もあるが、非結合型の濃度の考慮が必要となり(6)、基質によっては反応性の改善が認められない場合もある。さらに、in vitroの反応において、UGT酵素が活性化されて予期しない高い活性が認められる場合がある(7)。この活性化は、一定の範囲内の基質濃度のみで認められる場合が多く、基質濃度を変化させた検討が必要である理由の1つである。さらに、グルクロン酸抱合代謝物が、特定のUGT分子種に対してのみ強い酵素阻害を示すことも珍しくない(8)。補酵素の分解物であるUDPが他の分子種の活性阻害に働くことも知られているが(9)、この現象は反応液中での総活性値が高い場合に認められる。同じ基質に対して、異なる分子種が様々なキネティックを示すことも念頭に置く必要がある(図3)(10)。以上のように、

UGTの活性測定に際しては、多くの因子による影響に十分に注意を払う必要がある。

### (3) UGTの酵素活性による分子種同定と阻害試験

開発候補化合物の主代謝分子種の同定方法はCYPの場合と同様である。しかし、UGTは分子種間の基質認識の特異性が低いために、より注意して実施することが肝要である。ヒト肝ミクロソームにおける各分子種特異的な基質として、UGT1A1にはビリルビンまたはエストラジオール、UGT1A3にはトリフルオロペラジン、UGT1A9にはプロポフォル、UGT2B7にはモルフィンまたはジトブジンを使用するが、市販のヒト肝ミクロソームには各活性がデータシートとして添付されるようになってきた。これらを用いて、開発候補化合物のグルクロン酸抱合活性と各分子種の活性との相関を検討する。この時にヒト肝ミクロソームの検体において、各分子種の活性値が適度に分散している必要がある。

UGT分子種発現系を用いて開発候補化合物を代謝させ、分子種を同定する。この場合にもUGTの低い基質特異性を考慮する必要がある。in vivo推定 $K_m$ 値だけではなく、高い基質濃度で低親和性 (low affinity) 分子種の関与も必ず検討する必要がある。

阻害試験は特に慎重に実施する必要がある。UGTの分子種特異的な阻害薬はほとんど知られていない。従って、基本的には高親和性 (high affinity) 分子種の基質を阻害薬として用いる検討方法が実施される。さらに、肝ミクロソームとUGT発現系酵素の両者での阻害定数を比較検討する必要がある。こうした検討でも説明が難しい結果が得られることもあり、これには肝ミクロソームとUGT発現系の両者における膜環境の差異が影響していると考えられる。さらに、別の複数の種類の基質兼阻害薬について、 $K_m$ 、 $IC_{50}$  および検出限界値を考慮して検討する必要がある。

### (4) UGTと薬物間相互作用

UGTに起因する薬物間相互作用の臨床例はCYPと比較して著しく少なく、その程度も軽いとされている(1)。臨床例のまとめがKiangらによって報告されている(11)。開発候補化合物において、グルクロン酸抱合が主消失経路であり、単一分子種で触媒される場合には、薬物間相互作用を想定した検討が必須である。中でも、内因性基質であるビリルビンを抱合解毒できる分子種はUGT1A1のみであるために、阻害により高ビリルビン血症が惹起される場合がある(12)。また、CYPによる代謝物がUGT1A1を強く阻害することが高ビリルビン血症の原因となる場合もあるので注意が必要である(13)。

UGT2B7は、モルフィンを特異的基質とする分子種であり、さらに、アシルグルクロナイド生成反応を最も効率的に触媒する分子種でもある。UGT1A3もアシルグルクロナイド生成活性を少なからず有していることにも注意が必要である。最近、ナプロキセン、ジクロフェナク、ケトプロフェンなどNSAIDのアシルグルクロナイドの細胞障害性について詳しく検討し、細胞障害性について否定した報告がなされた(14)。また、生体内ではアシルグルクロナイドの生成反応と同時に、アシル体の分解反応を $\beta$ -グルクロニダーゼが触



媒していると考えられている。しかし、アシル体が生成することが良く知られているミコフェノール酸のアシル体生成の逆反応は、 $\beta$ -グルクロニダーゼではなく、ABHD10 ( $\alpha/\beta$  hydrolase domain containing 10) という酵素が専ら触媒していることが新たに報告された (15)。また、アシル体代謝物の物理化学的性質を指標として、前臨床試験における選別に役立てる試みにも関心が持たれている (16)。UGT によるアシル体への触媒反応は、多くの候補化合物やその代謝物において、避けられない場合が多いために、今後の定量的な毒性評価の慎重な確立が待たれている (17)。

UGT は PXR (pregnane X receptor) や CAR (constitutive androstane receptor) によって発現調節をされているために、こうした転写因子の発現に影響を及ぼす化合物について、開発段階で考慮する必要がある。転写因子が抱合酵素の活性に及ぼす影響の定量的評価法は確立されていない。さらに、UGT は Nrf2 (NF-E2-related factor 2) によって発現調節を受けており、キノン、カテコール、パーオキシドなどの親電子性化合物類によって誘導を受け、解毒能に影響を及ぼすことが考えられる。

遺伝子多型については、体質性黄疸に関連する多型が、クリグラー・ナジャール症候群 (Crigler-Najjar 症候群) やジルベール症候群 (Gilbert 症候群) について詳しく研究されている (18)。我が国では、塩酸イリノテカンの投与患者について、UGT1A1\*28 の遺伝子診断の実施についての保険適用が 2008 年 11 月から認可されている。

##### (5) UGT の種差と臓器分布

種差については、詳しい研究情報が極めて少ないのが現状であるが、ラット、マウスおよびサルの肝および小腸の分子種の mRNA レベルでの発現比の報告はなされている (19-21)。ラットおよびマウスの肝ミクロソームではイミプラミンやトリフルオロペラジンのグルクロン酸抱合活性は検出できない。肝ミクロソームにおけるエストラジオールのグルクロン酸抱合活性の  $K_m$  は、ヒトと同程度であるが、 $V_{max}$  はヒトの 15 倍ほど高い (20)。

In vitro からヒト in vivo への外挿を目指した in silico 系の開発には、正確なクリアランスの予測が必要である。そのためには、肝外組織、特に腸管組織における第 II 相代謝酵素についても詳しい定量的検討が必要であるが、研究が進展していない。エストラジオールのグルクロン酸抱合活性のクリアランスは、ヒトでは肝と小腸では、ほぼ同じであるが、ラットおよびマウスでは、小腸より肝で 7 倍ほど高い。他の基質においても同様の傾向が認められる (22)。

実験動物における、UGT 分子種の種類、発現量、基質特異性、さらには発現臓器差についても、さらに詳しく検討し、前臨床開発に資する必要がある。最終的には CYP と同様に特異的酵素活性比 (RAF: relative activity factor) による定量的予測ができることが望まれている。

## 2 硫酸抱合酵素 (SULT)

硫酸抱合を触媒する SULT は、主に *p*-ニトロフェノールなどのフェノール性水酸基を有する化合物や、アドレナリン、ドパミンやエストロゲンなどの内因性物質等を基質とする SULT1 ファミリー、アルコール性水酸基や内因性ステロイド類を基質とする SULT2 ファミリーと、アミンを基質とする SULT3 がある。

多くの内因性物質の代謝に主として硫酸抱合が係わることが知られている。しかし、環境化学物質以外の薬物等外来異物の硫酸抱合についてはミノキシジルの他に、タモキシフェン、ラロキシフェンやナプロキセンの代謝の一部に関与しているという報告がある他はほとんど知られていない。SULT は食品中に含まれるフラボノイド化合物やポリフェノール化合物によって強く阻害される場合がある。しかし、薬物によってヒト硫酸抱合活性が阻害された報告は無い。さらに、SULT は PXR によって転写調節されているが、PXR を活性化する薬物による相互作用の報告も無いため、現状では前臨床試験段階で特別の注意を払う必要がないと考えられている。

## 3 グルタチオン抱合酵素 (GST)

GST は求核性のグルタチオンと親電子性の化合物との抱合反応を触媒する酵素であり、主に肝可溶性画分に存在する。グルタチオン抱合は、化合物の水溶性を著しく上昇させ、胆汁や尿中への排泄を促進する重要な解毒排泄機構の 1 つである。すなわち、GST は主に CYP による薬物の代謝的活性化反応によって生じた反応性中間体 (反応性代謝物) とグルタチオンとの反応を触媒し、核酸やタンパク質などの生体高分子とアダクトを作ることを防ぐ解毒的な作用を発揮する。ヒト GST には 16 種類以上の分子種があり、そのうち 5 種類がメジャーな分子種である。GSTA や GSTM 分子種は基質特異性が低い。各分子種について遺伝子多型が報告されており、中でも GSTM1 および GSTT1 の完全欠損型のアレル頻度はともに約 50% である。代謝活性は二峰性の分布を示し、遺伝子量効果が強く見られる。GSTM1 と GSTT1 の両因子を欠損しているヒトは、タクリン (23) やトログリタゾン (24) による薬物性肝障害の頻度が有意に高いことが報告され注目されている。近年、開発初期段階において、主に CYP によって生成される反応性代謝物の生成を、*in vitro* で反応性代謝物のグルタチオンアダクトを測定して予測する試験が盛んに行われている。この試験は、反応性代謝物類の構造を決定しないで、アダクトに使用されたグルタチオン量を MS/MS で網羅的に定量測定する。反応性代謝物の解毒能の個人差と副作用発現の関連には、主として本酵素が関与していると考えられている。

## 4 アセチル抱合酵素 (NAT)

抗不整脈薬プロカインアミド、抗結核薬イソニアジドや炎症性腸疾患治療薬スルファサラゾピリジンは、*N*-アセチル体として尿中に排泄される。これらの薬物のアセチル化体比率には、著しい個人差が認められることは古くから知られている。これらの反応は NAT2

によって触媒され、PM (poor metabolizer) の割合は日本人で約 10% である。結核の薬物治療において、イソニアジドとリファンピシンの併用において、NAT2 の活性が低いヒトでは、ヒドラジンの生成に起因する肝障害発症のリスクが高くなると報告されている (25)。がん原性アリルアミンやヘテロサイクリックアミンの *N*-水酸化体は、NAT が *O*-アシル体にすることによって活性化されるため、専ら発がん性との関連研究が行われているが、基質となる薬の種類は極めて限られている。

### 5. メチル転移酵素

6-メルカプトプリン、6-チオグアニンやアザチオプリンのメチル化を触媒する酵素であるチオプリン *S*-メチル転移酵素 (TPMT) は、PM における造血障害などの重篤な副作用発現で有名である。TPMT の活性は赤血球と肝で相関する。日本人で報告されている PM 型である \*3C の遺伝子頻度が 0.008 であり、患者がこの因子をホモで有する PM である確率は極めて低いが、開発候補化合物の代謝が TPMT でメチル転移を受ける場合には注意が必要である。

生体内物質であるカテコールアミン、レボドパやメチルドパなどのカテコール類をメトキシ体に変換する肝可溶性画分に存在する酵素であるカテコール *O*-メチルトランスフェラーゼ (COMT) にも遺伝子多型による個人差が報告されている。エストラジオールから生成する DNA 障害性のあるカテコール体への代謝を COMT が触媒することから、乳がんの発生リスクとの関連が示唆されているが、薬物等の異物代謝に係わるという報告はない。

### 6. 第II相代謝酵素とトランスポーター

抱合酵素と排出型トランスポーターは機能的に関連していることが、肝臓、小腸や腎臓などで明らかにされて来ている。肝で生成されたグルクロン酸抱合体の多くは、MRP (multidrug resistance-associated protein) 2 によって胆汁中に排泄され、MRP1 や MRP3 によって血漿中に排泄される。グルタチオン抱合体も MRP2 や MRP3 の基質となる。硫酸抱合体は主として BCRP (breast cancer resistant protein/ABCG2) の基質となることが報告されている。排出型トランスポーターが薬物の体内動態におよぼす影響は、開発段階で必要な情報であるが、抱合活性と同時に定量的に評価できる *in vitro* スクリーニング系の確立が今後の課題である。

### おわりに

開発候補化合物が第II相酵素で直接代謝される場合には、当該酵素活性の個人差等の薬物動態への影響を考慮する必要がある。CYP による代謝物がさらに抱合反応を受けた二次代謝物についても体内動態を考慮しなければならない場合がある。この場合には、最初にヒトおよび実験動物のヘパトサイトを用いて、第I相と第II相代謝酵素を同時に評価することが推奨される。酵素活性の個人差が、試験結果に影響することをできるだけ避ける

ために、プールドヒトヘパトサイトなどが使われ始めている。今後、各酵素活性のフェノ  
タイピング用プローブ薬やカクテルプローブの開発が必要と思われる。近い将来、第Ⅱ相  
酵素が CYP と同じ研究レベルに到達し、第Ⅰ相酵素と第Ⅱ相酵素を包括的に考慮できる  
予測系の開発が望まれる。

#### 文 献

- 1) Williams JA, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2004;32:1201-1208.
- 2) Evans W, et al. *Science.* 1999;286:487-491.
- 3) Izukawa T, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2009;37:1759-1768.
- 4) Ohno S, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2009;37:32-40.
- 5) Cubitt HE, et al. *Pharm Res.* 2009;26:1073-1083.
- 6) Kilford PA, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2009;37:82-89.
- 7) Yamanaka H, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2005;33:23-30.
- 8) Watanabe Y, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2002;30:1462-1469.
- 9) Fujiwara R, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2008;36:361-367.
- 10) Uchaipichat V, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2004;32:413-423.
- 11) Kiang TK, et al. *Pharmacol Ther.* 2005;106:97-132.
- 12) Zhang D, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2005;1729-1739.
- 13) Katoh M, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2007;35:583-589.
- 14) Koga T, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2011;39:54-60.
- 15) Iwamura A, et al. *Proceeding for 25<sup>th</sup> JSSX annual meeting.* 2010;215.
- 16) Sawamura R, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2010;38:1857-1864.
- 17) Skonberg C, et al. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008;4:425-438.
- 18) [http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/sgc/ugt\\_alleles/](http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/sgc/ugt_alleles/)
- 19) Shelby MK, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2003;31:326-333.
- 20) Buckley DB, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2007;35:121-127.
- 21) Nishimura M, et al. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2009;24:139-144.
- 22) Shiratani H, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2008;36:1745-1752.
- 23) Simon T, et al. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;67:432-437.
- 24) Watanabe I, et al. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;73:435-455.
- 25) Ohno M, et al. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4:256-261.