

論文内容要旨

*In vitro*代謝試験系およびヒト肝細胞キメラマウスを用いた
フェルバメートの反応性代謝物生成メカニズムの解析

主指導教員：古武 弥一郎教授
(医系科学研究科 生体機能分子動態学)
副指導教員：黒田 照夫教授
(医系科学研究科 微生物医薬品開発学)
副指導教員：山野 幸子准教授
(医系科学研究科 生薬学)

佐藤 公也

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

<序論>

フェルバメート (felbamate, FBM) は 1993 年に米国食品医薬品局 (US Food and Drug Administration, FDA) により承認された抗てんかん薬である。FBM は、実験動物を用いた非臨床試験及びヒトにおける臨床試験では顕著な毒性を示さなかった一方、市販後に、重篤な肝毒性及び骨髄毒性が発生し、黒枠警告 (black box warning) が発せられた。これまでの研究により、FBM は第一段階目の代謝として、酸化あるいは加水分解を受けることが報告されている。また、加水分解を介して、反応性代謝物とよばれる、反応性に富んだ代謝物 2-phenylpropenal (2-PP) が生成し、それにより肝毒性を発症することが示唆されている。しかしながら、FBM の代謝に関与する薬物代謝酵素を含め、肝毒性の発現に至るメカニズムについては、これまでのところ十分な検討がなされていない。

本研究では、FBM の反応性代謝物生成メカニズムの解明及び臨床におけるより安全な FBM の使用に貢献することを目的として *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験を実施した。

In vitro 試験においては、ヒトの cytochrome P450 (CYP) 及び carboxylesterase (CES) の各分子種を発現させた発現系ミクロソームを用いて、FBM の酸化及び加水分解に関与する薬物代謝酵素について検討した。また、*in vivo* 試験においては、マウス肝細胞の大部分がヒト肝細胞に置換されたヒト化動物モデルであるヒト肝細胞キメラマウス (PXB マウス; 株式会社フェニックスバイオ) を用いて、FBM の代謝物プロファイルを評価するとともに、反応性代謝物の解毒に重要な役割を担うと考えられるグルタチオン (glutathione, GSH) の変動について解析した。

<実験方法>

In vitro 試験:

FBM (10 $\mu\text{mol/L}$) を、ヒトの CYP 及び CES の各分子種を発現させた発現系ミクロソームと 120 分間インキュベーションし、FBM の量を液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS) により測定した。120 分後に残存する FBM の量を指標に、FBM の酸化及び加水分解に関与する薬物代謝酵素について検討した。

In vivo 試験:

① FBM を 600 mg/kg で PXB マウスに単回経口投与し、2 時間後の血漿及び肝臓を採取した。採取した試料を UV 検出器付き液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with UV detector, LC-UV/MS) にて分析し、FBM の代謝物プロファイルを評価した。

② FBM を 600 mg/kg で PXB マウスに単回経口投与し、24 時間後の肝臓を採取した。採取した肝臓を凍結後に薄切して凍結肝切片を作成し、質量分析イメージング法 (mass spectrometry imaging, MSI) により内因性 GSH の変動を解析した。

<結果及び考察>

In vitro 試験：

FBM を CYP 発現系マイクロソームとインキュベーションしたところ、残存する FBM の量は CYP2C8, CYP2C9 及び CYP2E1 発現マイクロソームで有意に低下した。また、FBM を CES 発現系マイクロソームとインキュベーションしたところ、残存する FBM の量は CES1c 発現マイクロソームで有意に低下した。これらの結果より、FBM の酸化代謝には CYP2C8, CYP2C9 及び CYP2E1 が関与し、加水分解代謝には CES1c が関与することが示唆された。

In vivo 試験：

①FBM を投与後の血漿を LC-UV/MS 分析したところ、未変化体及び 10 種類の代謝物が検出された。また、FBM を投与後の肝臓より、未変化体及び 7 種類の代謝物が検出された。これら検出された代謝物には、FBM の酸化及び加水分解で生成する代謝物に加え、2-PP が GSH 抱合を受けて生成する代謝物が複数含まれていた。これらの結果より、FBM を PXB マウスに投与後、2-PP が生成し、2-PP は GSH 抱合による解毒代謝を受けることが示唆された。

②PXB マウスより採取した肝臓を MSI 分析し、内因性 GSH の変動を解析したところ、FBM の投与により GSH が減少傾向を示すことが確認された。この結果より、2-PP を解毒代謝する過程で内因性 GSH が減少し、そのことが FBM による肝毒性に関与している可能性が示唆された。

<結論>

In vitro 試験において、FBM の酸化代謝に CYP2C8, CYP2C9 及び CYP2E1 が関与し、加水分解代謝に CES1c が関与することが示唆されたことから、CYP2C8, CYP2C9 及び CYP2E1 による酸化代謝が 2-PP の生成を回避し、CES1c による加水分解代謝が 2-PP の生成につながる代謝経路となるものと考えられた。従って、CYP2C8, CYP2C9 及び CYP2E1 を介した薬物間相互や、CYP2C9 の遺伝子多型は、FBM による肝毒性のリスク要因となる可能性が示唆された。

In vivo 試験において、2-PP が GSH 抱合を受けて生成する代謝物が複数検出されるとともに、FBM の投与により、肝臓で内因性 GSH が減少することが確認された。これらの結果より、2-PP を解毒代謝する過程で GSH が減少し、そのことが FBM による肝毒性に関与している可能性が示唆された。

また、本研究を通して、PXB マウスは、ヒトの代謝物プロファイルに加え、GSH のような内因性物質の変動を評価可能なヒト化動物モデルであると考えられた。こうした点を踏まえると、PXB マウスは反応性代謝物による肝毒性のメカニズム解明やリスク評価を行う上で有用なヒト化動物モデルになるものと考えられた。

本研究で得られた結果は、FBM の反応性代謝物生成メカニズムの解明及び臨床において、FBM をより安全に使用する上で有用な基礎的知見になるものと考えられる。