

博 士 論 文

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

広島大学大学院医歯薬学総合研究科
創生医科学専攻
生体機能分子動態学研究室
佐藤 公也

目次

序論	1
本論	5
第 I 章 フェルバメート (FBM) の代謝に関与する薬物代謝酵素の検討	5
第 1 節 緒言	5
第 2 節 実験方法	8
I-2-i) 化合物及び試薬	8
I-2-ii) 肝ミクロソームを用いた FBM の代謝試験	8
I-2-iii) Cytochrome P450 (CYP) 及び carboxylesterase (CES) 発現系ミクロソームを用いた薬物代謝酵素の検討	9
I-2-iv) 統計解析	9
第 3 節 結果	10
I-3-i) 肝ミクロソームを用いた FBM の代謝試験	10
I-3-ii) CYP 及び CES 発現系ミクロソームを用いた薬物代謝酵素の検討	15
第 4 節 小括	17
第 II 章 ヒト肝細胞キメラマウス (PXB マウス) を用いた FBM の代謝物プロファイル及び毒性評価	20
第 1 節 緒言	20
第 2 節 実験方法	24
II-2-i) 化合物及び試薬	24
II-2-ii) 実験動物	24
II-2-iii) PXB マウスにおける FBM の代謝物プロファイル評価	24
II-2-iv) 質量分析イメージング法 (MSI) を用いた glutathione (GSH) の変動解析	25
II-2-v) FBM を投与後の肝機能パラメーター評価	26
II-2-vi) 統計解析	26
第 3 節 結果	28
II-3-i) PXB マウスにおける FBM の代謝物プロファイル評価	28
II-3-ii) MSI を用いた GSH の変動解析	36
II-3-iii) FBM を投与後の肝機能パラメーター評価	39
第 4 節 小括	40
結論	44
論文目録	46

謝辭	47
参考文献	48

略語一覧

本論文においては以下の略語を用いた。

2OH-FBM:	2-hydroxy felbamate
2-PP:	2-phenylpropenal
ALP:	alkaline phosphatase
ALT:	alanine aminotransferase
AST:	aspartate aminotransferase
CBMA:	3-carbamoyl-2-phenylpropionaldehyde
CCMF:	4-hydroxy-5-phenyltetrahydro-1,3-oxazin-2-one
CES:	carboxylesterase
CPPA:	3-carbamoyl-2-phenylpropionic acid
CYP:	cytochrome P450
ESI:	electrospray ionization
FBM:	felbamate
FDA:	US Food and Drug Administration
GSH:	glutathione (reduced form)
GSSG:	glutathione (oxidized form)
HPLC:	high-performance liquid chromatography
ICH:	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
IDT:	idiosyncratic drug toxicity
LC-MS:	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LC-UV/MS:	liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with UV detector
MALDI:	matrix assisted laser desorption/ionization
MCF:	monocarbamate felbamate
MCF-gluc:	glucuronide of MCF
[M + H] ⁺ :	proton adduct
[M + K] ⁺ :	potassium ion adduct
MSI:	mass spectrometry imaging
MW:	molecular weight

MW175:	felbamate metabolite with molecular weight of 175
MW295:	felbamate metabolite with molecular weight of 295
MW439:	felbamate metabolite with molecular weight of 439
MW441:	felbamate metabolite with molecular weight of 441
MW455:	felbamate metabolite with molecular weight of 455
<i>m/z</i> :	mass-to-charge ratio
Nac-acid:	<i>N</i> -acetylcystein conjugated metabolite of 2-PP
Nac-OH:	<i>N</i> -acetylcystein conjugated metabolite of 2-PP
NADPH:	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
PXB-mice:	chimeric mice with humanized liver
pOH-FBM:	<i>p</i> -hydroxy felbamate
SCID:	severe combined immunodeficiency disease
SULT:	sulfotransferase
SD:	standard deviation
uPA:	urokinase-type plasminogen activator
UGT:	uridine 5'-diphospho-glucuronosyl transferase
UV:	ultraviolet

序論

創薬研究におけるコンビナトリアルケミストリーの導入や、化合物ライブラリーの拡充、ハイスループットな評価系の構築などにより、今日、数多くの化合物が医薬品候補として評価されている。創薬段階では1万以上の化合物がスクリーニングにより評価され、動物実験などによる絞り込みが行われたのち、臨床試験を経てようやく1つの医薬品が世の中に生み出される。こうした医薬品の研究開発過程において、臨床試験段階に入って開発を中止することは、コスト面の負担や時間のロスが大きく、臨床試験の成功確率を上げることは製薬会社のみならず、新薬を待ち望む患者にとっても重要である。

医薬品の開発中止の原因として、1990年代前半頃までは薬物動態が主な原因として挙げられていたが、その後、ヒト組織を利用した薬物動態研究が可能となったことなどにより、2000年代には薬物動態が原因での医薬品の開発中止は大幅に減少した(Kola et al., 2004)。一方で、薬効や毒性(副作用)が原因で開発中止となった化合物の中にも、その要因として薬物動態が関係している例が多いことが指摘されており(Kola et al., 2004)、薬物動態の視点から薬効や毒性を考察することは重要であると考えられる。

医薬品の薬効や毒性リスクを薬物動態面から考察する上では、未変化体に加えてヒトで生成される代謝物を予測し、評価することが重要である。医薬品の研究開発過程における代謝物評価については、2008年に米国食品医薬品局(US Food and Drug Administration; FDA)により発行された「Metabolites in Safety Testing (MIST)」ガイダンス及び2009年に日米EU医薬品規制調和国際会議(Interational Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; ICH)より発行された「M3(R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals (ICH M3(R2))」ガイドラインで定められている。

これらの規定では、未変化体あるいは薬物関連物質の総曝露量に対して10%を超える代謝物については、毒性試験における代謝物の曝露量を考慮した上で、非臨床試験で代謝物の毒性評価をすることが定められており、ヒトの薬物代謝プロファイルに基いた毒性リスク評価は、より安全な医薬品を提供することに加え、開発コストの低減、開発期間の短縮においても重要であると考えられる。

フェルバメート (felbamate ; FBM) は 1993 年に FDA により承認された抗てんかん薬であり，北米において Felbatol[®] の商品名で発売されている (United States Prescribing Information: felbatol[®])。FBM の構造を Fig. 1 に示す。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 FBM の投与を受けた患者において，重篤な肝毒性及び骨髄毒性が発生し (Kaufman et al., 1997)，黒枠警告 (black box warning) が公布されることになった。これにより，現在，FBM の使用は難治性のてんかん患者に限定し，リスクとベネフィットを勘案して慎重に投与することが求められている (United States Prescribing Information: felbatol[®])。

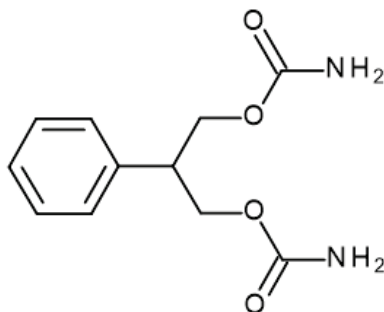


Fig. 1. Chemical structure of felbamate.

薬物による毒性は，「中毒性」と「特異体質性」の2つに大別される。中毒性薬物毒性は，用量依存性があり動物実験の結果がヒトに外挿可能である。一方，特異体質性薬物毒性 (idiosyncratic drug toxicity; IDT) は，毒性の発現に用量依存性が無く，また，発症頻度が稀であるために動物実験や臨床試験では検出することが困難で，医薬品として承認され，より多くの患者に投与されるようになって初めて検出される (Ikeda, 2015)。IDT による毒性発現メカニズムに関しては不明な点が多いものの，少なくとも以下に示す3つの要因が関与していると考えられている。

- ① 薬物要因：反応性代謝物とよばれる反応性の高い代謝物を体内で生成することによる。
- ② 遺伝的要因：薬物代謝酵素やトランスポーター，受容体などの遺伝子多型による。
- ③ 環境要因：食生活や肥満，飲酒，喫煙などの生活習慣による。

この3者が複合的に関与して発症するものと考えられている（山田ら，2006）（Fig. 2）。その中でも特に反応性代謝物の生成は IDT の発現に関与する重要な因子であると考えられており（Park et al., 1998），医薬品の研究開発においては，反応性代謝物のヒト肝細胞への共有結合量を指標に毒性リスクを評価する手法が取り入れられている（Nakayama et al., 2009）。

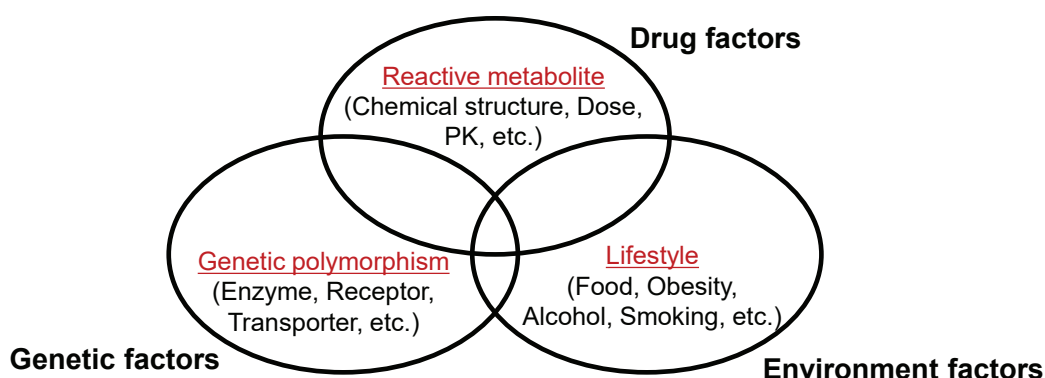


Fig. 2. Three factors of IDT

IDT による肝毒性を発現する薬剤の例として，吸入麻酔薬である halothane が挙げられる。Halothane は，10000 人～100000 人に 1 人という頻度でアレルギー性肝障害を発症することが知られているが（Park et al., 2005），この肝障害は，肝臓で cytochrome P450 (CYP) 2E1 による代謝的活性化を受けて生成する反応性代謝物 trifluoroacetyl chloride が，タンパク質をトリフルオロアセチル化して抗原性を示すことにより引き起こされると考えられている（Park et al., 2005 ; Satoh et al., 1985 ; Walgren et al., 2005）。また，世界初のインスリン抵抗性糖尿病治療薬として承認された troglitazone は，死亡例を含む重篤な肝障害の発生により，発売からわずか3年で市場撤退することとなった（Walgren et al., 2005）。Troglitazone による肝毒性には，マクロン環由来のキノンエポキシドやキノンメチド型の反応性代謝物，あるいはチアゾリジンジオン環由来のスルフェン酸やケトイソシアネート型の反応性代謝物が関与することが示唆されている（Kassahun et al., 2001 ; Smith, 2003 ; Tettey et al., 2001）。

FBMによる肝毒性も、薬物の代謝臓器である肝臓において、反応性代謝物を生成することにより発生するIDTであると考えられているものの、FBMの代謝に関与する酵素を含め、その詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、FBMの反応性代謝物生成メカニズムの解明及びより安全なFBMの臨床使用への貢献を目的として検討を実施した。

第 I 章 FBM の代謝に関与する薬物代謝酵素の検討

第 1 節 緒言

FBM の臨床試験では、 $[^{14}\text{C}]$ 標識 FBM ($[^{14}\text{C}]$ FBM) を用いたマスバランス試験において、FBM の代謝物として、FBM の酸化代謝により生成する 2-hydroxy felbamate (2OH-FBM) 及び *p*-hydroxy felbamate (*p*OH-FBM)、また FBM の加水分解代謝により生成する monocarbamate felbamate (MCF) と、MCF が更に酸化代謝を受けて生成する 3-carbamoyl-2-phenylpropionic acid (CPPA) の 4 つの代謝物が同定された (Adusumalli et al., 1993 ; Yang et al., 1991)。市販後に FBM を投与した患者において重篤な肝毒性が発生したことから、未同定の中間代謝物を含めた FBM の代謝物に関する研究が行われ、その中で、MCF から CPPA を生成するまでの間に中間代謝物としてアルデヒド型の代謝物 3-carbamoyl-2-phenylpropionaldehyde (CBMA) が存在する可能性が提唱された (Thompson et al., 1996)。CBMA が生成すると、 β 離脱反応により、 α , β 不飽和アルデヒドである 2-phenylpropenal (2-PP) が生成すると考えられている (Thompson et al., 1996)。

α , β 不飽和アルデヒドは、抗悪性腫瘍薬 cyclophosphamide の代謝物である acrolein に代表されるように、一般的に非常に高い求電子性を示すことが知られている (Dieckhaus et al., 2002)。Thompson ら (1996) は、FBM 及び 2-PP を含む複数の FBM 代謝物を合成し、*in vitro* で細胞障害活性を検討したところ、2-PP の細胞障害活性がもっとも高く、2-PP の細胞障害活性は、 α , β 不飽和アルデヒドである acrolein や 4-hydroxynonenal と比較しても最も高かったことを報告している。また、2-PP はリン酸緩衝液中で glutathione (GSH) と容易に反応し、GSH との結合体を生成することが報告されている (Dieckhaus et al., 2001)。こうした情報を踏まえ、現在、FBM による肝毒性の発現には反応性代謝物として 2-PP が関与していると考えられている。

[¹⁴C]FBM を用いたマスバランス試験に加え、その後の *in vitro* 試験の結果も踏まえて、現在、FBM の代謝経路としては Fig. 3 に示す代謝経路が推定されている。

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、酸化代謝により 2OH-FBM 及び pOH-FBM を生成し、加水分解代謝により MCF を生成すると考えられている (Fig. 3)。反応性代謝物である 2-PP は、加水分解により生成する MCF を介して生成すると考えられることから、FBM の酸化代謝による 2OH-FBM 及び pOH-FBM の生成は、反応性代謝物の生成を回避し、加水分解による MCF の生成は反応性代謝物の生成につながる代謝経路であると考えられる。しかしながら、これらの代謝に関与する薬物代謝酵素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。

そこで本章では、FBM の代謝に関与する薬物代謝酵素を明らかにすることを目的として *in vitro* 代謝試験を実施した。

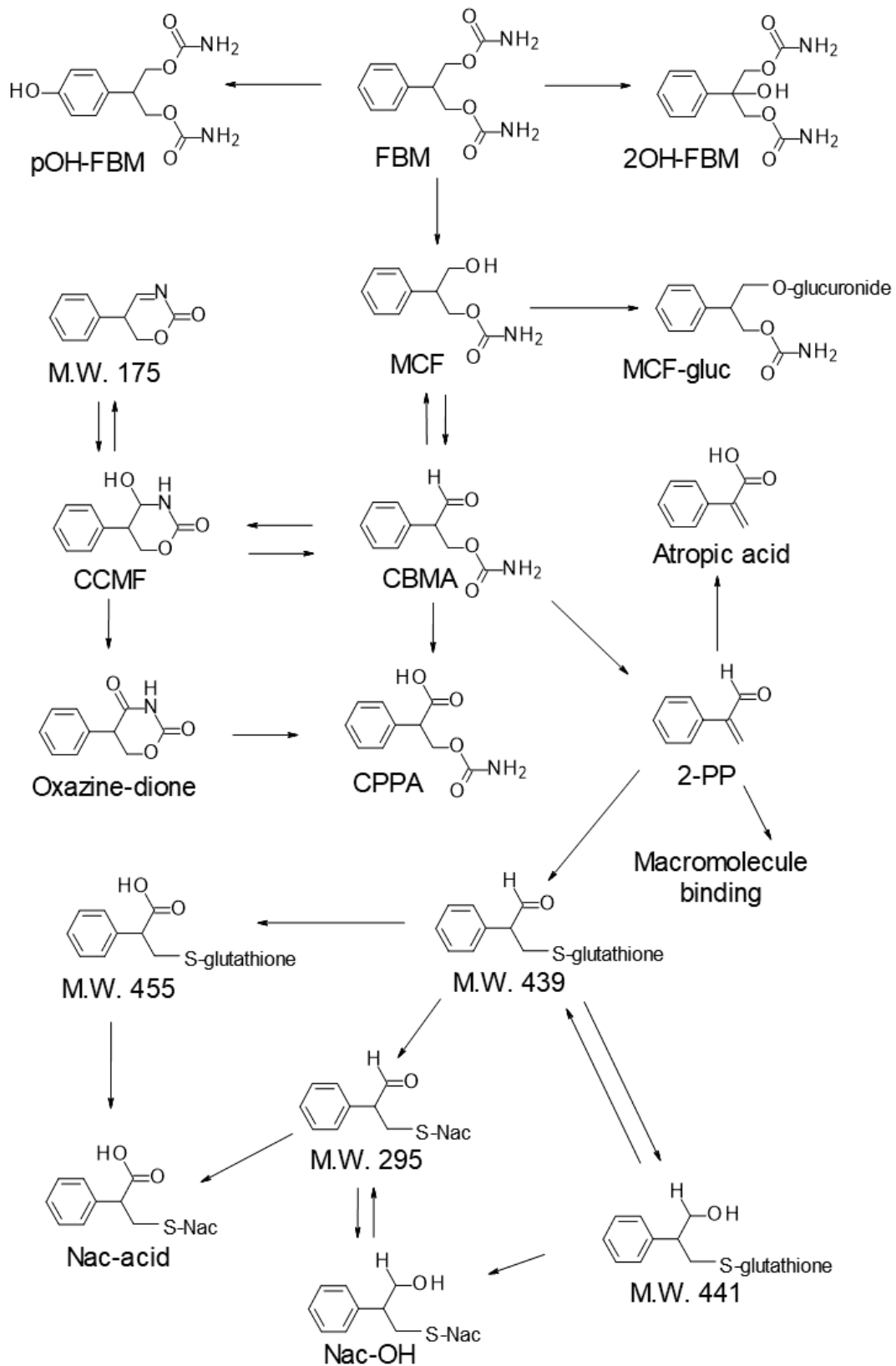


Fig. 3. Postulated metabolic pathway of FBM

(Dieckhaus et al., 2001, 2002; Kapetanovic et al., 2002)

第2節 実験方法

I-2-i) 化合物及び試薬

FBMはSigma-Aldrichより購入した。肝ミクロソーム(ヒト, ラット, マウス)はXenotechより購入した。バキュロウイルス感染昆虫細胞由来各種ヒトCYP分子種発現系ミクロソーム(CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2J2, CYP3A4, CYP3A5)及びバキュロウイルス感染昆虫細胞由来各種ヒトcarboxylesterase (CES)分子種発現系ミクロソーム(CES1b, CES1c, CES2)はCORNINGより購入した。NADPH-regenerating system reagentsはBD Biosciencesより購入した。その他の試薬及び溶媒は高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography, HPLC)用あるいは特級の市販品を用いた。

I-2-ii) 肝ミクロソームを用いたFBMの代謝試験

ヒト, ラット及びマウス肝ミクロソーム(最終濃度として1 mg/mL)を酵素源, NADPHを補酵素として, PBS (pH 7.4)中でFBM(最終濃度として10あるいは100 µmol/L)を37°C条件下にて0, 10, 30, 60, 90及び120分間反応させた。反応液と等量の氷冷したアセトニトリルを添加することで反応を停止させ, 4°C, 3000 rpmで10分間遠心分離した。上清を膜フィルターを用いて遠心濾過後, 濾液をHPLC(Agilent 1290 Infinity, Agilent Technologies)にOrbitrap質量分析装置(Orbitrap Velos Pro, Thermo Fisher Scientific)を接続した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)に注入し, positive ion modeにてFBM, 酸化代謝物であるOH-FBM及び加水分解代謝物であるMCFを測定した。分析カラムはACQUITY UPLC BEH 18 (1.7 µm, 2.1 × 100 mm, Waters)を用いた。移動相には, ミリQ水:ギ酸(1000:1, v/v)(移動相A)とアセトニトリル:ギ酸(1000:1, v/v)(移動相B)を用いた。移動相の勾配は, 注入後0 minから3 minまで移動相Bの割合を5%に保ち, 3 minから12 minまで5%から70%まで直線的に

上昇させ、12 min から 15 min まで 70%と一定とした。

I-2-iii) CYP 及び CES 発現系ミクロソームを用いた薬物代謝酵素の検討

ヒト CYP 発現系ミクロソーム（最終濃度として 100 pmol/mL）あるいはヒト CES 発現系ミクロソーム（最終濃度として 1 mg/mL）を酵素源、NADPH を補酵素として、PBS (pH 7.4) 中で FBM（最終濃度として 10 μ mol/L）を 37°C、120 分間反応させた。120 分後に反応液と等量の氷冷したアセトニトリルを添加することで反応を停止させ、4°C、3000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を膜フィルターを用いて遠心濾過後、濾液を HPLC (Agilent 1290 Infinity, Agilent Technologies) に Orbitrap 質量分析装置 (Orbitrap Velos Pro, Thermo Fisher Scientific) を接続した LC-MS に注入し、positive ion mode にて残存する FBM 量を測定した。分析カラムは ACQUITY UPLC BEH 18 (1.7 μ m, 2.1 \times 100 mm, Waters) を用いた。移動相には、ミリ Q 水 : ギ酸 (1000 : 1, v/v) (移動相 A) とアセトニトリル : ギ酸 (1000 : 1, v/v) (移動相 B) を用いた。移動相の勾配は、注入後 0 min から 3 min まで移動相 B の割合を 5%に保ち、3 min から 12 min まで 5%から 70%まで直線的に上昇させ、12 min から 15 min まで 70%と一定とした。

I-2-iv) 統計解析

CYP 及び CES 発現系ミクロソームを用いた薬物代謝酵素の検討 (I-2-iii) において、有意差の検定は Dunnett 検定により実施した。p 値が 0.05 未満を統計的に有意とみなした。

第3節 結果

I-3-i) 肝ミクロソームを用いたFBMの代謝試験

FBM (10 $\mu\text{mol/L}$) を NADPH の存在下でヒト肝ミクロソームと 0, 10, 30, 60, 90 及び 120 分間インキュベーションしたところ、ミクロソーム中の FBM の量はインキュベーション時間の増加に伴って低下する傾向が確認された (Fig. 4)。この結果を踏まえ、以降の実験は十分に反応が進んでいると考えられるインキュベーション時間 120 分で実施した。

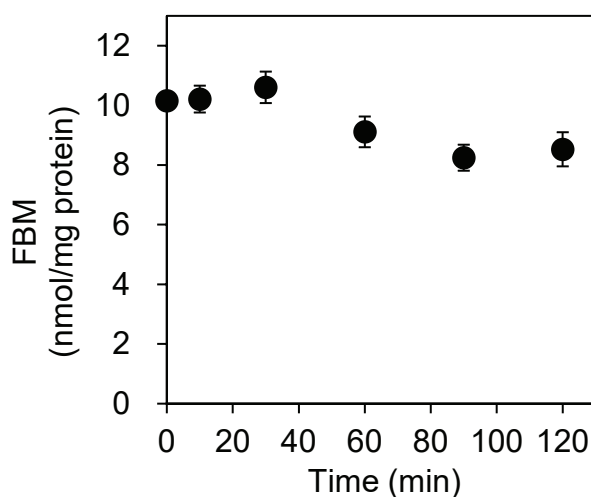


Fig. 4. Time course of *in vitro* metabolism of FBM in human liver microsomes. FBM were incubated with human liver microsomes in the presence of NADPH for 0, 10, 30, 60, 90 and 120 min. Amount of FBM were monitored by LC-MS. Data represent the mean \pm SD (n=3).

FBM の酸化及び加水分解の種差について検討するため、ヒト、ラット及びマウス肝ミクロソームを用いて検討を行った。

FBM (100 $\mu\text{mol/L}$) を NADPH の存在下でヒト、ラット及びマウス肝ミクロソームと 120 分間インキュベーションしたところ、全ての肝ミクロソーム中から酸化代謝物である OH-FBM が検出された (Fig. 5)。また、加水分解代謝物である MCF はヒトとマウスの肝ミクロソーム中からは検出された一方、ラット肝ミクロソーム中からは検出されなかった (Fig. 5)。

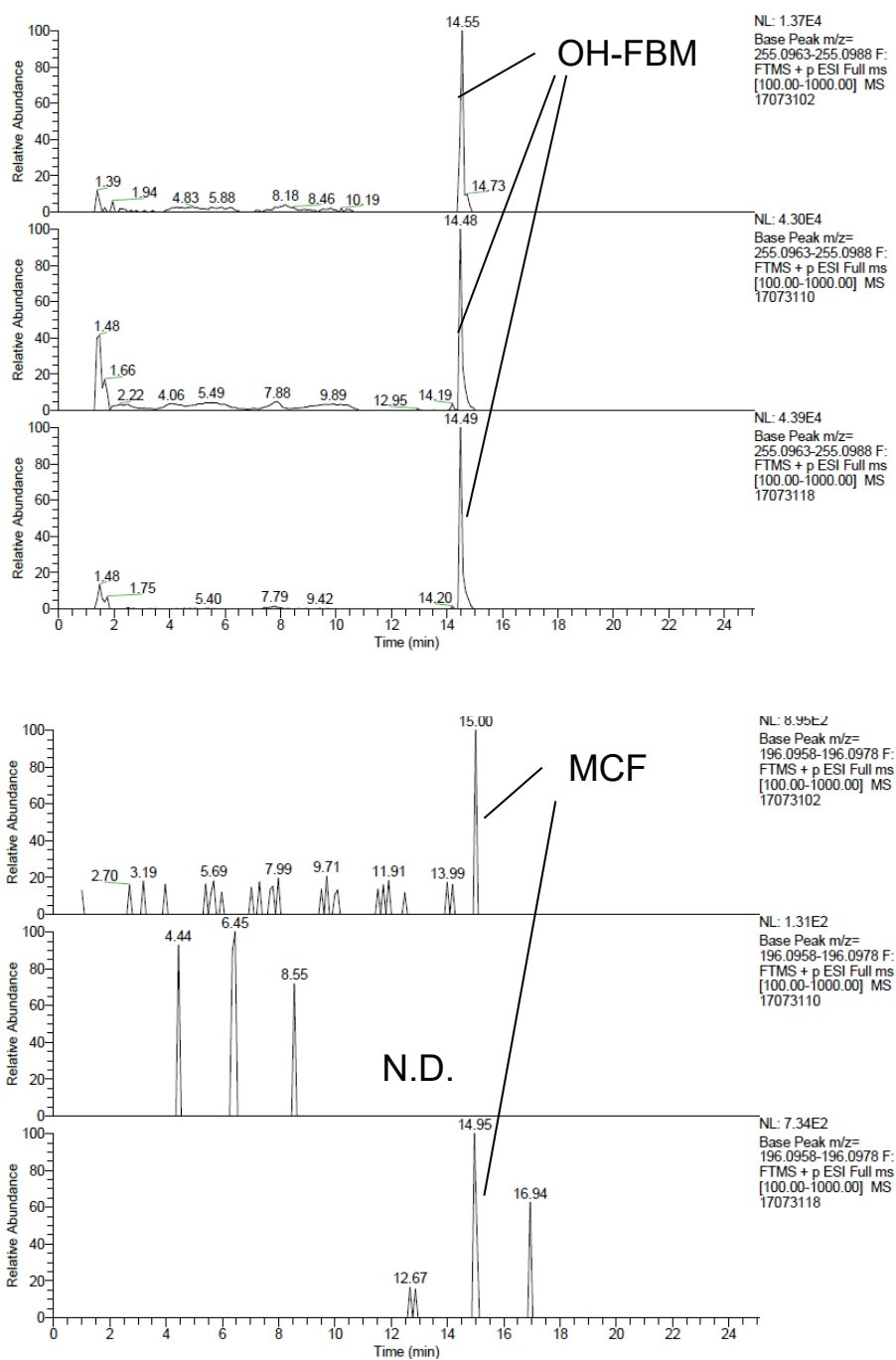


Fig. 5. *In vitro* metabolism of FBM in human, rat and mouse liver microsomes with NADPH. FBM were incubated with human (upper column), rat (middle column) and mouse (lower column) liver microsomes in the presence of NADPH for 120 min. Formation of OH-FBM and MCF were monitored by LC-MS. N.D.: Not detected

次に NADPH の非存在下でヒト，ラット及びマウス肝ミクロソームを用いて同様の検討を行ったところ，OH-FBM はヒト，ラット，マウスいずれの肝ミクロソーム中からも検出されなかった (Fig. 6)。一方で，MCF は検討を行った全ての肝ミクロソーム中から検出された (Fig. 6)。

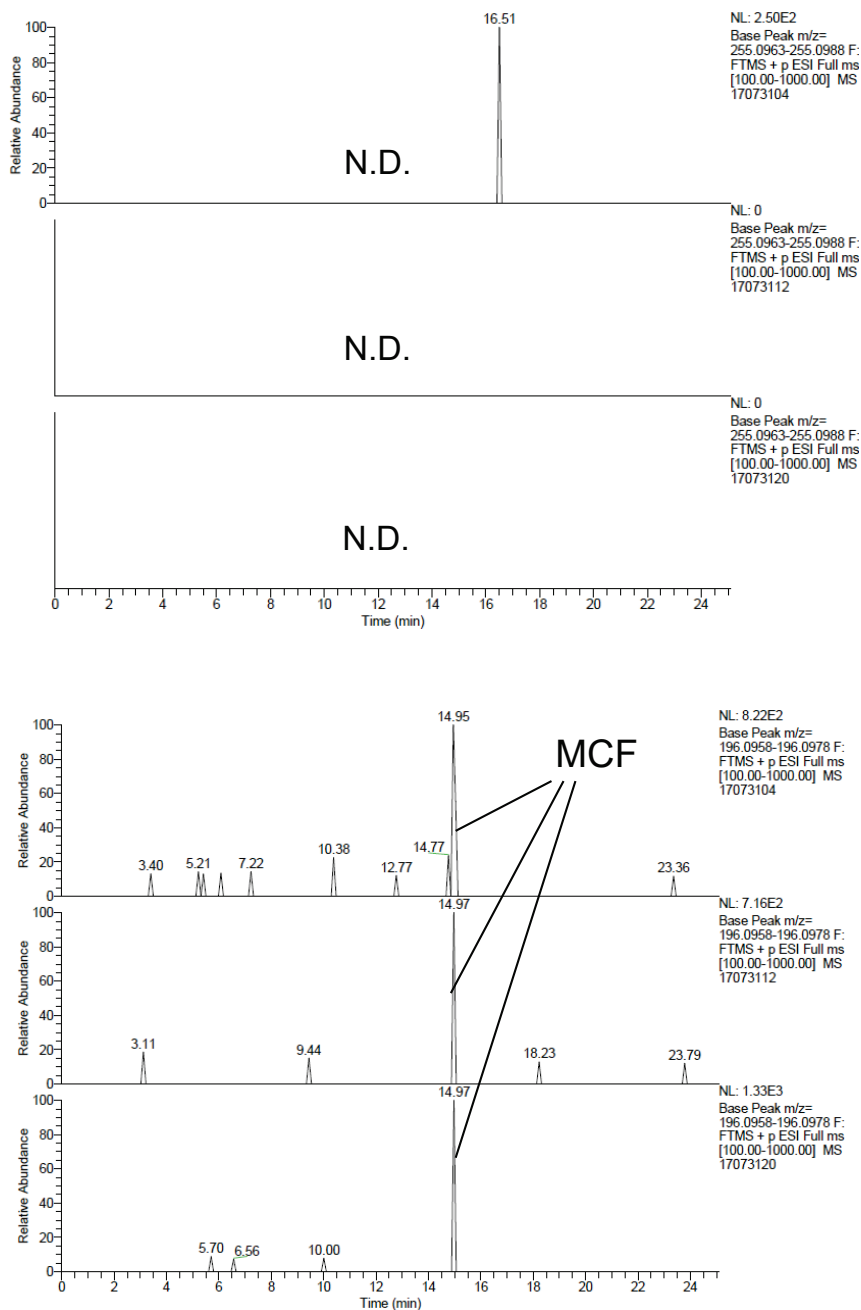


Fig. 6. *In vitro* metabolism of FBM in human, rat and mouse liver microsomes without NADPH. FBM were incubated with human (upper column), rat (middle column) and mouse (lower column) liver microsomes in the absence of NADPH for 120 min. Formation of OH-FBM and MCF were monitored by LC-MS. N.D.: Not detected

FBM を NADPH の存在下及び非存在下でヒト，ラット，マウス肝ミクロソームとインキュベーションした際の OH-FBM 及び MCF の LC-MS 分析におけるピーク面積値を Table 1 に示す。

Table 1. Comparison of MS peak area of OH-FBM and MCF in human, rat and mouse liver microsomes with or without NADPH.

(A)

Biological materials	Species	Cofactor	MS Peak Area of OH FBM	Peak Area Ratio of OH-FBM (Animal/Human)	MS Peak Area of MCF	Peak Area Ratio of MCF (Animal/Human)
Liver microsomes	Human	NADPH	119691	1	4843	1
	Rat	NADPH	329660	2.75	N.D.	-
	Mouse	NADPH	338606	2.83	5909	1.22

(B)

Biological materials	Species	Cofactor	MS Peak Area of OH FBM	Peak Area Ratio of OH-FBM (Animal/Human)	MS Peak Area of MCF	Peak Area Ratio of MCF (Animal/Human)
Liver microsomes	Human	-	N.D.	-	6937	1
	Rat	-	N.D.	-	3895	0.56
	Mouse	-	N.D.	-	7316	1.05

FBM were incubated with human, rat and mouse liver microsomes in the presence (A) or absence (B) of NADPH for 120 min. Formation of OH-FBM and MCF were monitored by LC-MS. N.D.: Not detected

ヒト，ラット及びマウス肝ミクロソームを用いた検討において，酸化代謝物である OH-FBM は NADPH の存在下で検出され，その生成量はヒトと比較してラット及びマウスで約 3 倍程度高いことが明らかとなった (Table 1 (A))。OH-FBM は NADPH の非存在下では検出されず，また，加水分解代謝物である MCF は NADPH の非存在下においても全ての肝ミクロソーム中から検出された (Table 1 (B))。さらに，NADPH の存在下及び非存在下において生成した MCF のピーク面積値を比較すると，いずれの肝ミクロソームにおいても，NADPH 存在下と比較して NADPH の非存在下において MCF の生成量が増加傾向を示すことが確認された (Table 1 (A), (B))。

これらの結果より、FBM の酸化代謝には NADPH を必要とする酸化代謝酵素として広く知られている CYP が関与し、加水分解代謝には NADPH を必要としないミクロトーム画分に局在する加水分解酵素として広く知られている CES が関与する可能性が示唆された。また、酸化代謝が起こらないと考えられる NADPH 非存在下の条件において MCF の生成量が増加傾向を示したことから、酸化代謝が阻害されることで 2-PP の生成につながる MCF の生成が増加することが示唆された。

I-3-ii) CYP 及び CES 発現系マイクロソームを用いた薬物代謝酵素の検討

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さらに検討するため、ヒト CYP 発現系マイクロソーム及びヒト CES 発現系マイクロソームを用いて検討を行った。

FBM (10 $\mu\text{mol/L}$) をヒトの各 CYP 分子種を発現させたマイクロソームとインキュベーションしたところ、120 分後の FBM の残存量は CYP2C8, CYP2C9 及び CYP2E1 発現マイクロソームで有意に低下した (Fig. 7)。

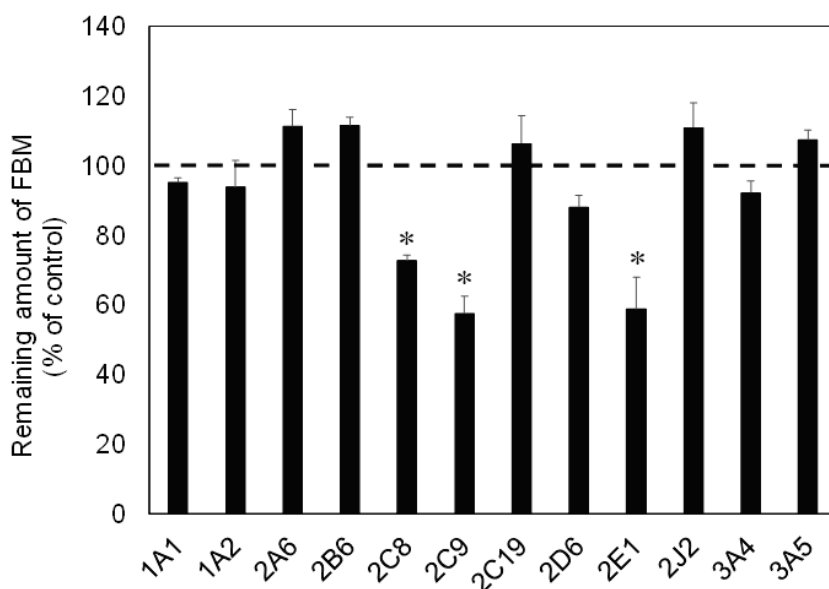


Fig. 7. *In vitro* metabolism of FBM in recombinant human CYP expressing microsomes. FBM were incubated with human CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2J2, CYP3A4 and CYP3A5 expressing microsomes for 120 min. Remaining amount of FBM were measured by LC-MS. Data represent the mean \pm SD (n=3). *p<0.05 vs control microsomes.

また、FBM をヒトの各 CES 分子種を発現させたマイクロソームとインキュベーションしたところ、120 分後の FBM の残存量は CES1c 発現マイクロソームにおいて有意に低下した (Fig. 8)。

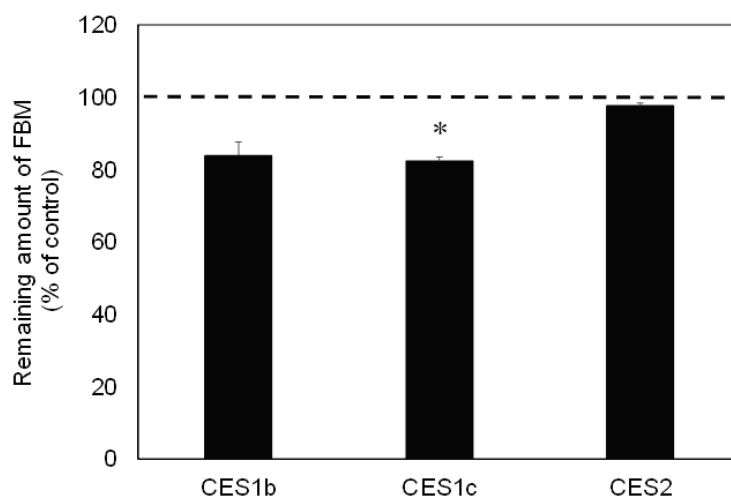


Fig. 8. *In vitro* metabolism of FBM in recombinant human CES expressing microsomes. FBM were incubated with human CES1b, CES1c and CES2 expressing microsomes for 120 min. Remaining amount of FBM were measured by LC-MS. Data represent the mean \pm SD (n=3). *p<0.05 vs control microsomes.

以上の結果から、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。

第4節 小括

本章では、肝ミクロソーム、ヒト CYP 発現系ミクロソーム及び CES 発現系ミクロソームを用いて FBM の代謝に関与する薬物代謝酵素の検討を行った。

肝ミクロソームを用いた検討において、酸化代謝物である OH-FBM は NADPH の存在下で生成する一方、NADPH の非存在下では生成しないことが明らかとなった (Fig. 5, Fig. 6)。また、加水分解代謝物である MCF は、NADPH の非存在下においても生成することが確認された (Fig. 6)。これらの結果より、FBM の酸化代謝には NADPH を必要とする代謝酵素である CYP、加水分解代謝には NADPH を必要としない代謝酵素である CES の関与が示唆された。

また、MCF の生成量は、NADPH 存在下と比較して、酸化代謝が起こらないと考えられる NADPH 非存在下において増加傾向を示した (Table 1)。本研究においては、肝ミクロソーム中で反応性代謝物である 2-PP は検出されていない (data not shown)。2-PP が Fig.4 に示す多段階の反応を経て生成することや、2-PP の反応性が高いことを踏まえると (Dieckhaus et al., 2001 ; Thompson et al., 1996), *in vitro* 条件下で 2-PP を検出し、その変動を解析することは困難であると考えられる。しかしながら、NADPH 非存在下で MCF の生成量が増加した結果は、FBM を投与した際に、何らかの要因で酸化代謝が阻害されると、MCF の生成量が増加し、2-PP の増加につながる可能性を示唆しているものと考えられた。

さらに、MCF はヒトにおいて NADPH の存在下で検出されている一方、ラットにおいては NADPH の存在下では検出されていない (Fig. 5)。この結果は、ラットにおいては通常の代謝反応条件下では、加水分解代謝に比べて酸化代謝が優位に働いていることを示唆していると考えられ、このことが、FBM の毒性試験において肝毒性が検出されなかったことに一部関与している可能性が考えられた。

ヒト CYP 及び CES 発現系ミクロソームを用いた検討において、インキュベーション 120 分後の FBM の残存量は CYP2C8, CYP2C9, CYP2E1 発現ミクロソーム及び CES1c 発現ミクロソームで有意に低下した (Fig. 7, Fig. 8)。これらの結果より, FBM の酸化代謝に CYP2C8, CYP2C9 及び CYP2E1 が関与し, 加水分解代謝に CES1c が関与するものと考えられた。また, CES1c を介した加水分解代謝が 2-PP の生成に関与し, CYP2C8, CYP2C9 及び CYP2E1 を介した酸化代謝が 2-PP の生成を回避する重要な代謝経路となることが示唆された。

一般的に, 薬物の代謝に関与する酵素を検討する際は, 酵素の阻害剤や分子種発現系を用いた検討が行われる。本研究では, 分子種発現系であるヒト CYP 及び CES 発現系ミクロソームを用いて検討を行った。Glue ら (1997) は CYP の阻害剤を用いた検討から, FBM の代謝に CYP3A4 及び 2E1 が関与することを報告している。本研究において, FBM の残存量は CYP2E1 発現ミクロソームで有意に低下したものの, CYP3A4 発現ミクロソームでは低下しなかった。この乖離については現在のところ不明であるものの, CYP 発現系と CYP 阻害剤という双方の試験方法の違いが原因である可能性が考えられる。

これまでの研究から, CYP2C 分子種の発現には種差があることが知られており, ヒトに比べてげっ歯類では Cyp2c の発現量が高く, げっ歯類においては Cyp2c が主要な薬物代謝酵素であることが報告されている (Martignoni et al., 2006)。このような CYP2C 分子種の発現量の違いが, 肝ミクロソームを用いた検討において, ヒトと比べてラット及びマウスで OH-FBM の生成量が多かったことに関係していた可能性が考えられる (Table 1)。

CES1 はヒトの肝臓に最も豊富に存在する薬物代謝酵素の 1 つである一方, CES2 は主に小腸に発現していることが報告されている (Di, 2019)。従って, ヒトにおいて毒性発現臓器と同じ肝臓に発現する CES1c を介して MCF を生成するものと考えられた。

本研究では FBM の加水分解に関与するげっ歯類の CES 分子種については検討していない。げっ歯類ではヒトと比べて多くの CES 分子種が発現していることや (Di, 2019), ヒトとげっ歯類の CES の相同性が 67-77% であると報告されていることを踏まえると (Taketani et al., 2007 ; Hosokawa, 2008), FBM の加水分解に関与する CES の分子種は, ヒトとげっ

菌類で異なる可能性も考えられる。

CYP2C9 には遺伝子多型が存在することが知られており, tolbutamide, phenytoin, warfarin など, 様々な薬物の代謝が遺伝子多型の影響を受けることが報告されている (Goldstein, 2001)。また CES の活性は個体間差が大きいことが知られている (Di, 2019)。

このような情報を踏まえると, FBM の投与による 2-PP の生成は, CYP2C8, CYP2C9, CYP2E1 を介した薬物間相互作用, CYP2C9 の遺伝子多型, CES1c 活性の個体間差などにより影響を受ける可能性が考えられる。

従って, FBM の臨床使用において, 2-PP の生成を回避する CYP2C8, CYP2C9 及び CYP2E1 で代謝される薬物との併用, あるいは CYP2C9 の遺伝子多型を有する患者への投与は, FBM による肝毒性のリスク要因になる可能性が示唆された。

第II章 ヒト肝細胞キメラマウスを用いたFBMの代謝物プロファイル及び毒性評価

第1節 緒言

一般的に、薬物のヒトにおける代謝物プロファイルを検討するために、ヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験が行われている。しかし、この手法によるヒト代謝物の予測精度は、酸化、還元などの第1相代謝反応で 50-69%、グルクロン酸抱合、硫酸抱合などの第2相代謝反応で 47%であり、特に多段階の反応を経由して生成する代謝物の予測精度は低いことが報告されている (Dalvie et al., 2008)。

FBMはFig.3に示す通り、2-PPを含めた多くの代謝物が第1相代謝反応、第2相代謝反応を含む多段階の代謝反応により生成すると考えられており、ヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験からは、FBMのヒトでの代謝物プロファイルを十分に検証することは難しいと考えられる。

ヒトにおける代謝物プロファイルを検討する方法として、近年、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) を用いた研究が数多く報告されている (De Serres et al., 2011; Inoue et al., 2009; Kamimura et al., 2010; Yamazaki et al., 2010)。

PXBマウスは urokinase type plasminogen activator (uPA) 遺伝子をマウスアルブミンエンハンサーに組み込み、肝臓特異的に発現させることで肝障害を発症した uPAマウスと、免疫不全の性質を有する severe combined immunodeficiency disease (SCID) マウスを掛け合わせることで、肝障害と免疫不全の性質を併せ持つ uPA/SCID マウスを作成し、このマウスをホストとしてヒトの肝細胞を移植することで作成される (Tateno et al., 2015) (Fig. 9)。PXBマウスにおいては、マウス肝細胞の大部分がヒト肝細胞に置換されており、その置換率は約 80%と報告されている (Tateno et al., 2015)。

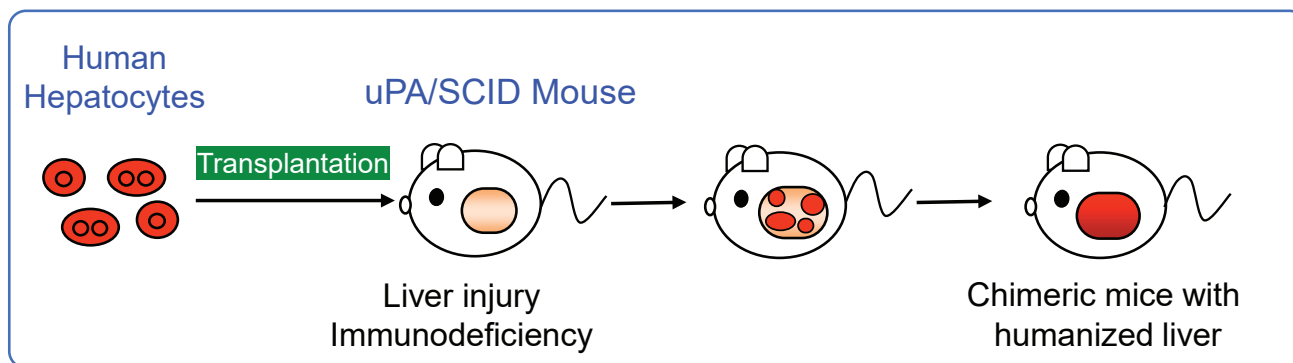


Fig. 9. Production of chimeric mice with humanized liver (PXB-mice).

これまでの研究により，PXB マウスにおける CYP 代謝酵素及び uridine 5'-diphosphoglucuronosyl transferase (UGT) や sulfotransferase (SULT) といった non-CYP 代謝酵素の発現レベルや活性は，ヒトと同程度であることが報告されており (Katoh et al., 2004, 2005 ; Katoh and Yokoi, 2007 ; Kitamura et al., 2008 ; Nishimura et al., 2005 ; Ohtsuki et al., 2014), PXB マウスはヒトにおける薬物動態を予測するためのヒト化動物モデルとして注目されている。

また，Kakuni ら (2012) は，ヒトにおいて反応性代謝物に起因する IDT により肝毒性を発症すると考えられている troglitazone を PXB マウスに投与することで，ALT 及び AST の上昇が見られ，PXB マウスにおいて肝毒性が発現したことを報告している。

これらの報告を踏まえると，PXB マウスはヒトにおける反応性代謝物の生成を介した肝毒性を評価する上で有用なヒト化動物モデルになると考えられる。

FBM は，その推定代謝経路 (Fig. 3) より，反応性代謝物である 2-PP が生成したのち，GSH 抱合を受けると推定される。しかしながら，反応性代謝物の生成から肝毒性の発現に至るまでのメカニズムを，臨床でヒトの肝臓を用いて直接的に評価することは困難であることから，ヒト肝臓を有する PXB マウスは FBM の毒性メカニズムを解明する上で有用な動物モデルとなることが期待される。

薬物が臓器に与える影響を直接的に評価する方法として、近年、組織切片を用いた質量分析イメージング法 (mass spectrometry imaging, MSI) が注目されている (Nishidate et al., 2019)。MSI は、ヒトの生体組織診断により得られた臨床サンプル、あるいは動物の臓器より作成される組織切片を質量分析に供することで、試料中に含まれる薬物や生体内物質をイオン化し、その位置情報と併せてデータ取得することにより、薬物や生体内物質の分布を画像化する手法である (Fig. 10)。

MSI ではイオン化された分子を質量分析装置で検出するため、測定対象物質の m/z が分かれば、標品を用いることなく組織中での分布を評価することが可能である。

これまでに MSI を用いた検討により、薬物及びその代謝に加えて、内因性物質であるリン脂質の分布を評価可能であったこと (Sugiura et al., 2010 ; Takai et al, 2015)。がん患者の生体組織診断により得られたサンプルを用いて、内因性物質ホスファチジルイノシトールの分布を、がん組織と正常組織部分に分けて解析が可能であったこと (Goto et al., 2014 ; Kawashima et al., 2013 ; Shimma et al., 2007)。また、特発性肺線維症治療薬 pirfenidone の投与後に変動する生体内バイオマーカーの検出が可能であったことなどが報告されている (Sun et al, 2016)。

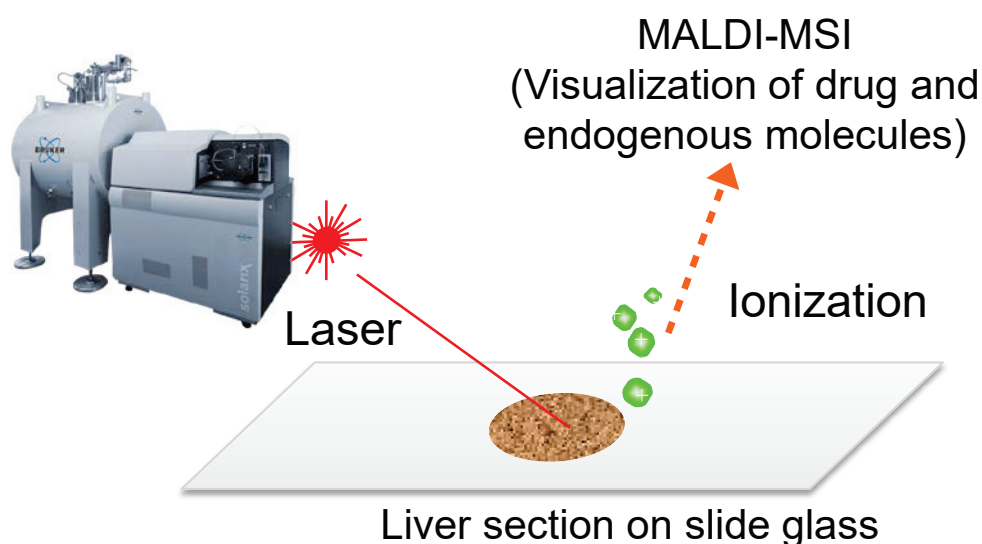


Fig. 10. Overview of MALDI-MSI.

こうした背景を踏まえ、本章では、PXB マウスを用いて FBM を投与後の代謝物プロファイルを評価するとともに、MSI を用いて FBM の投与がヒトの肝臓に与える影響について検討を行った。

第2節 実験方法

II-2-i) 化合物及び試薬

FBM は Sigma-Aldrich あるいは AK Scientifics より購入した。2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) は東京化成工業より購入した。その他の試薬及び溶媒は HPLC 用あるいは特級の市販品を用いた。

II-2-ii) 実験動物

PXB マウスは、Tateno ら (2015) の方法に従って作成された。具体的には、cDNA-uPA^{wild/+}/SCID マウスを宿主とし、ヒトの肝細胞ドナーとして BD195 (BD Biosciences) を移植することにより作成した。実験には血液中のヒトアルブミン濃度が 7.0 mg/mL 以上の雄性の個体を用いた。PXB マウスの作成及び化合物の投与、採材は株式会社フェニックスバイオにて承認された実験計画に従って実施された。

II-2-iii) PXB マウスにおける FBM の代謝物プロファイル評価

FBM を 0.5%カルボキシメチルセルロースに懸濁して 600 mg/10 mL/kg で PXB マウスに経口投与し、2 時間後の血漿及び肝臓を採取した (n=3)。肝臓は PBS (pH 7.4) と混合して 20%ホモジネートを調製した。各血漿及び 20%肝ホモジネートサンプルを等量ずつ混合し、プール血漿及びプール肝ホモジネートサンプルを調製した (n=3→1)。プール血漿及びプール肝ホモジネートサンプルに等量のアセトニトリルを添加し、4°C, 3000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を膜フィルターを用いて遠心濾過後、濾液を HPLC (Agilent 1290 Infinity, Agilent Technologies) に UV 検出器と Orbitrap 質量分析装置 (Orbitrap Velos Pro, Thermo Fisher Scientific) を接続した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) に注入し、

波長 210nm における吸光度及び positive ion mode にて得られた FBM 及び代謝物の精密質量と MS/MS フラグメントの情報をもとに構造を推定した。分析カラムは CAPCELL PAK C18AQ (3 μ m, 3 \times 250 mm, 資生堂) を用いた。移動相には, ミリ Q 水 : ギ酸 (1000 : 1, v/v) (移動相 A) とアセトニトリル : ギ酸 (1000 : 1, v/v) (移動相 B) を用いた。移動相の勾配は, 注入後 0 min から 10 min まで移動相 B の割合を 0% に保ち, 10 min から 95 min まで 0% から 95% まで直線的に上昇させ, 95 min から 100 min まで 100% と一定とした。本測定において FBM 及び各代謝物の検出に用いたプロトン付加体 $[M + H]^+$ の m/z を Table 2 に示す。

Table 2. List of m/z used in metabolite profiling study.

Analytes	Ion mode	m/z
FBM	Positive	239.10263
CBMA		194.08117
CCMF		194.08117
2OH-FBM		255.09755
<i>p</i> OH-FBM		255.09755
MCF		196.09682
MW441		442.16425
CPPA		210.07608
MCF-gluc		372.12891
Nac-OH		298.11076
Nac-acid		312.09002

II-2-iv) MSI を用いた GSH の変動解析

FBM を 0.5% メチルセルロースに懸濁して 600 mg/10 mL/kg で PXB マウスに経口投与し, 24 時間後の肝臓を採取した。肝臓をドライアイスで凍結し, クライオマイクロトーム (CRYO STAR NX70, Thermo Fisher Scientific) にて 10 μ m の厚さに薄切して凍結肝切片を作成した。マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI) のマトリックスとして DHB を 0.1% トリフルオロ酢酸含有 50% メタノール溶液に溶解して凍結肝切片上に塗布し, MSI 用の分析サンプルとした。マトリックス塗布後の凍結肝切片を Solarix XR (Bruker Daltonics) にて分析し, FBM, FBM 代謝物及び内因性物質の分布を

解析ソフト flexImaging (Bruker Daltonics) にて画像化した。MSI 分析において測定対象の検出に用いたカリウムイオン付加体[M + K]⁺の *m/z* を Table 3 に示す。

Table 3. List of *m/z* used in MSI.

Analytes	Ion mode	<i>m/z</i>
FBM	Positive	277.0585
2-pp		171.0207
Atropic acid		187.0156
MW175		214.0265
CPPA		248.0320
Oxazine-dione		230.0214
CBMA		232.0370
CCMF		232.0370
2OH-FBM		293.0534
<i>p</i> OH-FBM		293.0534
MCF		234.0527
MW295		334.0510
MCF-gluc		410.0848
MW439		478.1045
Nac-OH		336.0666
Nac-acid		350.0459
MW441		480.1201
GSH		346.0470
GSSG		651.1151
Ophthalmic acid		328.0905

II-2-v) FBM を投与後の肝機能パラメーター評価

II-2-iv において FBM を投与した PXB マウスより血漿を採取した。得られた血漿を臨床化学分析装置 (FUJI DRI-CHEM analyzer, 富士フイルム) で分析し, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) 及び alkaline phosphatase (ALP) を測定した。

II-2-vi) 統計解析

FBM を投与後の肝機能パラメーター評価 (II-2-v) において, 有意差の検定は *t* 検定によ

り実施した。 p 値が 0.05 未満を統計的に有意とみなした。

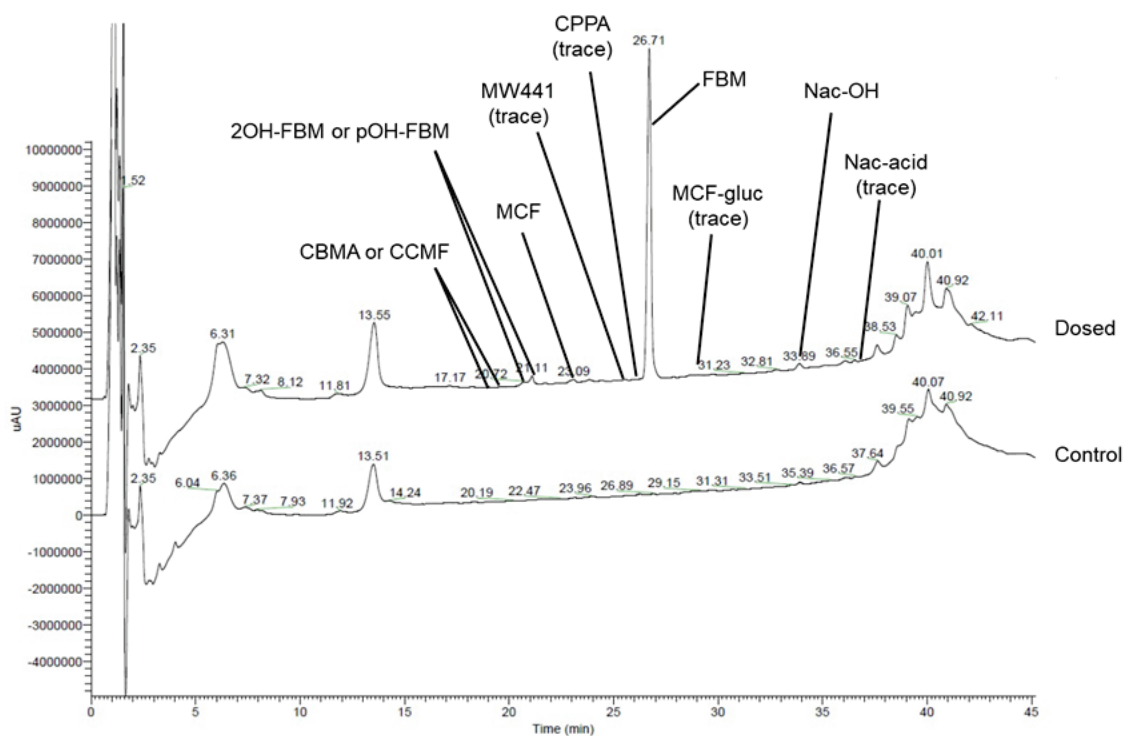
第3節 結果

II-3-i) PXB マウスにおける FBM の代謝物プロファイル評価

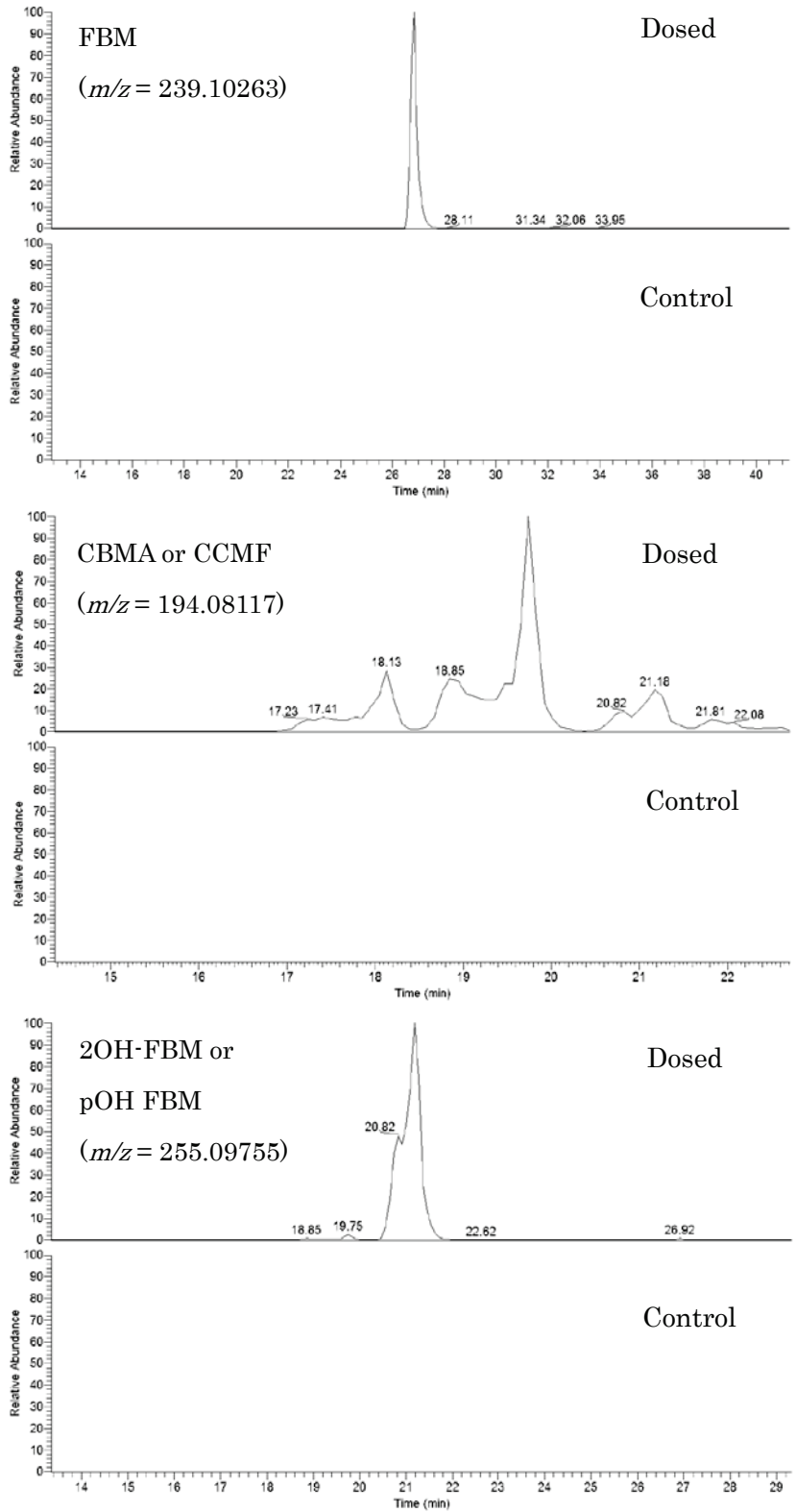
FBM を PXB マウスに投与後の血漿を LC-UV/MS 分析し、FBM の代謝物プロファイルを評価した。

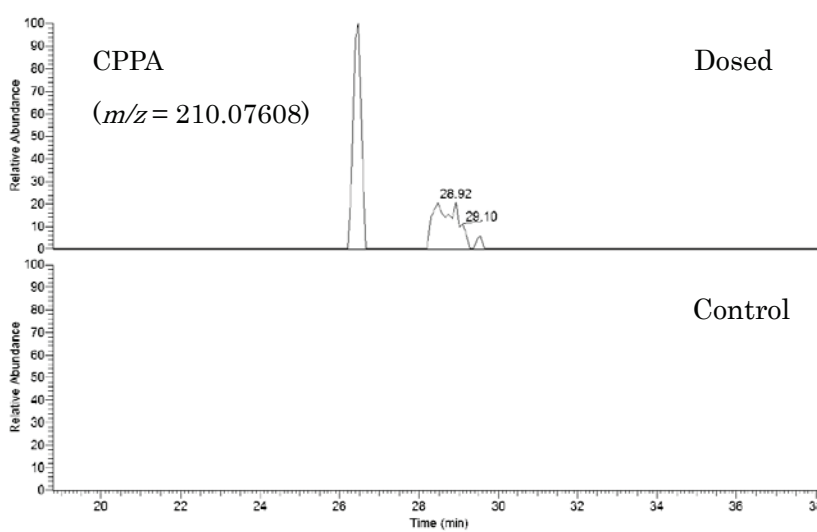
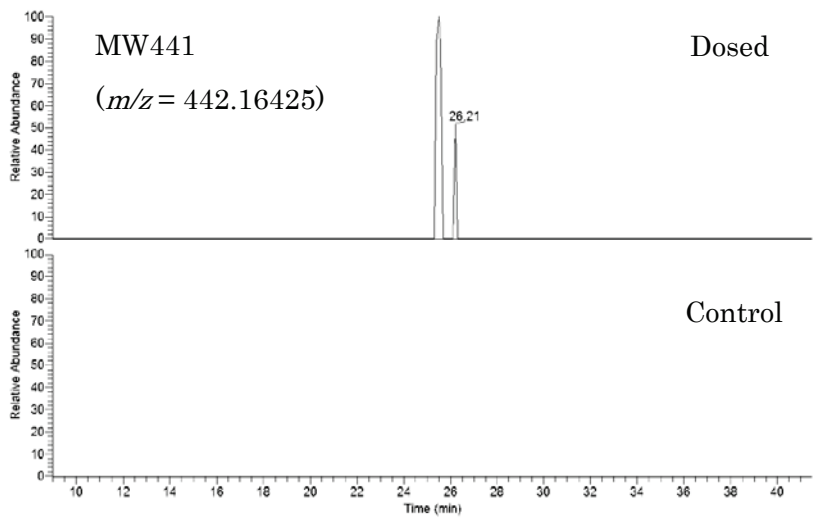
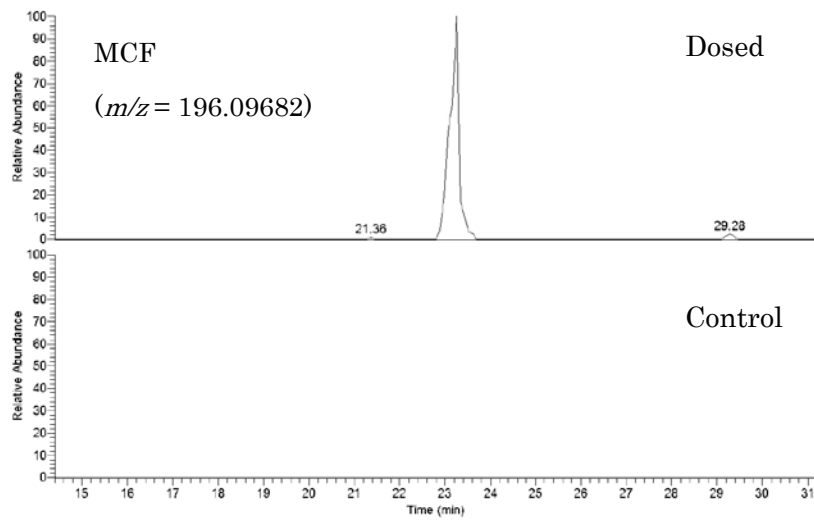
FBM を投与後の UV クロマトグラムより、血漿中からは FBM 及び代謝物として OH-FBM, CBMA, CCMF, MCF, Nac-OH が検出された (Fig. 11 (A))。また、抽出イオンクロマトグラムより、これらの代謝物に加え MW441, CPPA, MCF-gluc, Nac-acid が検出された (Fig. 11 (B))。

(A) UV Chromatogram



(B) Extracted Ion Chromatogram





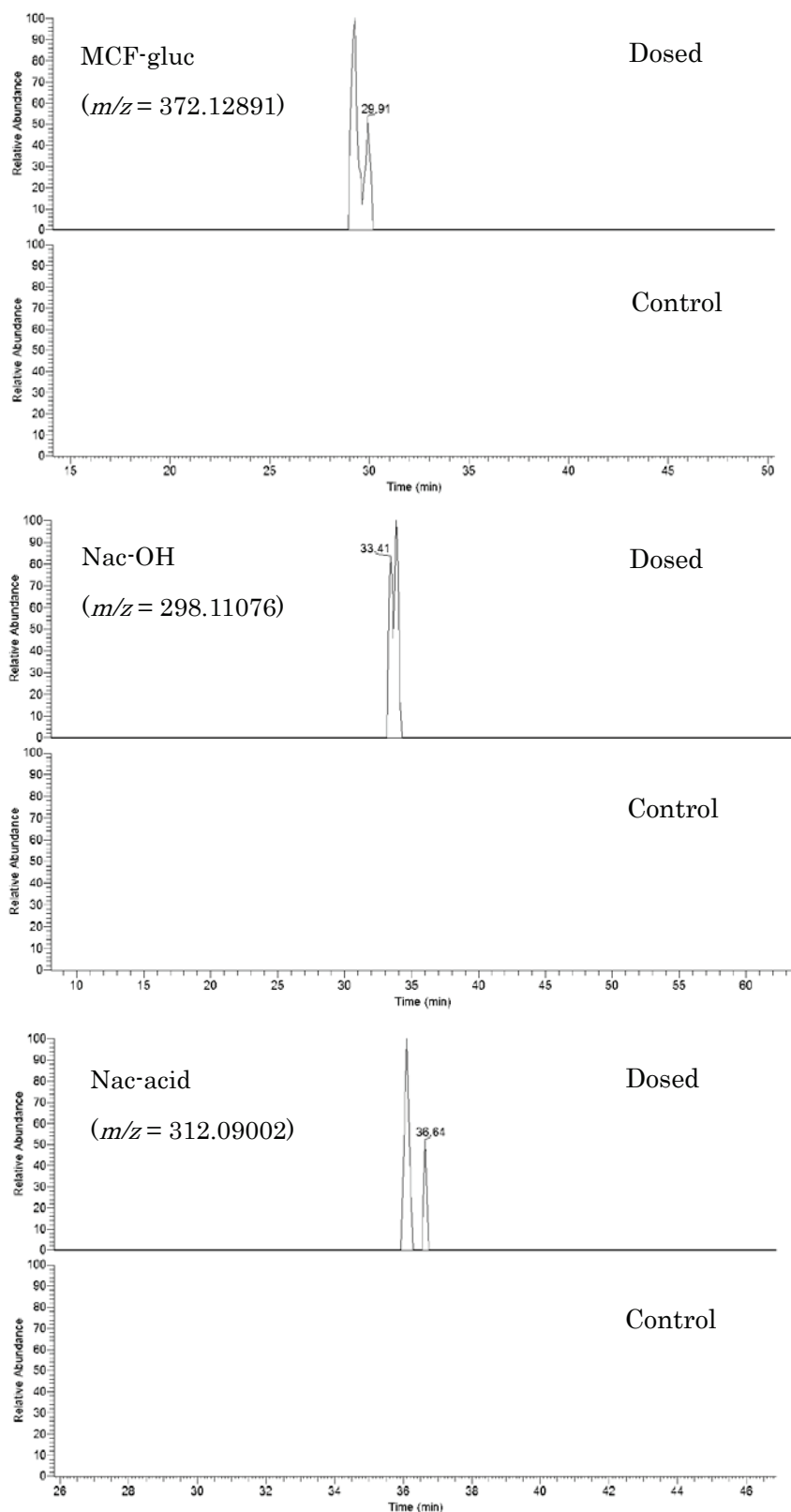
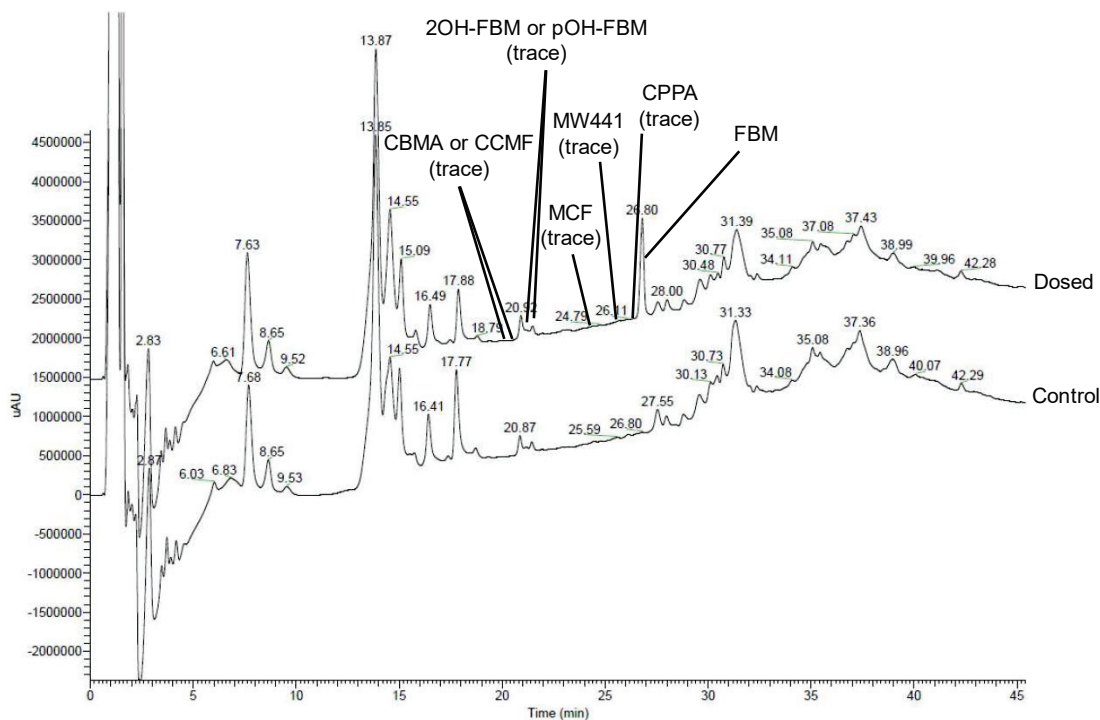


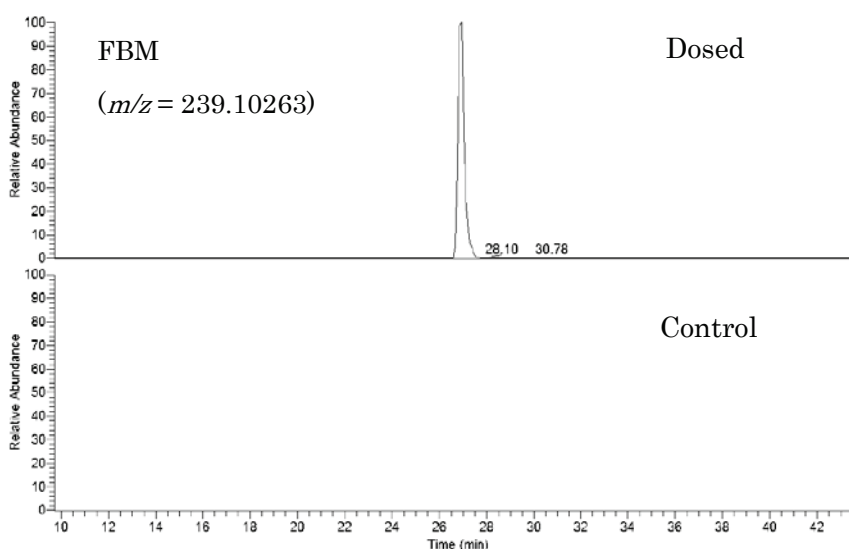
Fig. 11. UV (A) and extracted ion chromatograms (B) of plasma from PXB-mice. FBM were orally administered to PXB-mice at 600 mg/kg and plasma samples were collected 2 h after administration. Trace: detected only by MS.

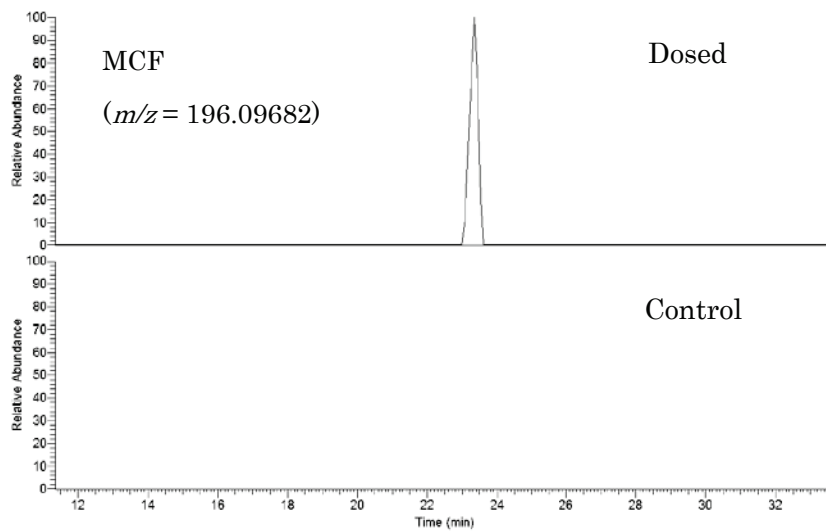
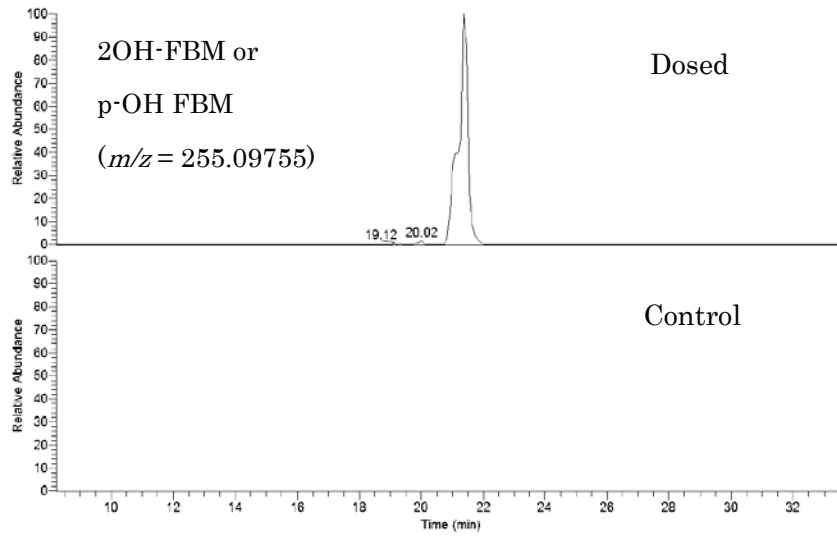
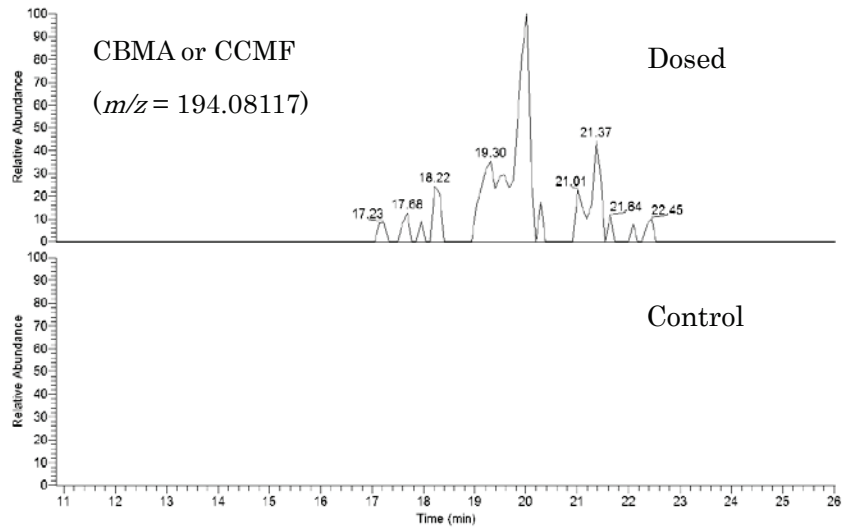
次に FBM を PXB マウスに投与後の肝ホモジネートを LC-UV/MS 分析したところ、UV クロマトグラムより、FBM が検出された (Fig. 12 (A))。また、抽出イオンクロマトグラムより、FBM に加えて代謝物として CBMA, CCMF, OH-FBM, MCF, MW441, CPPA が検出された (Fig. 12 (B))。

(A) UV Chromatogram



(B) Extracted Ion Chromatogram





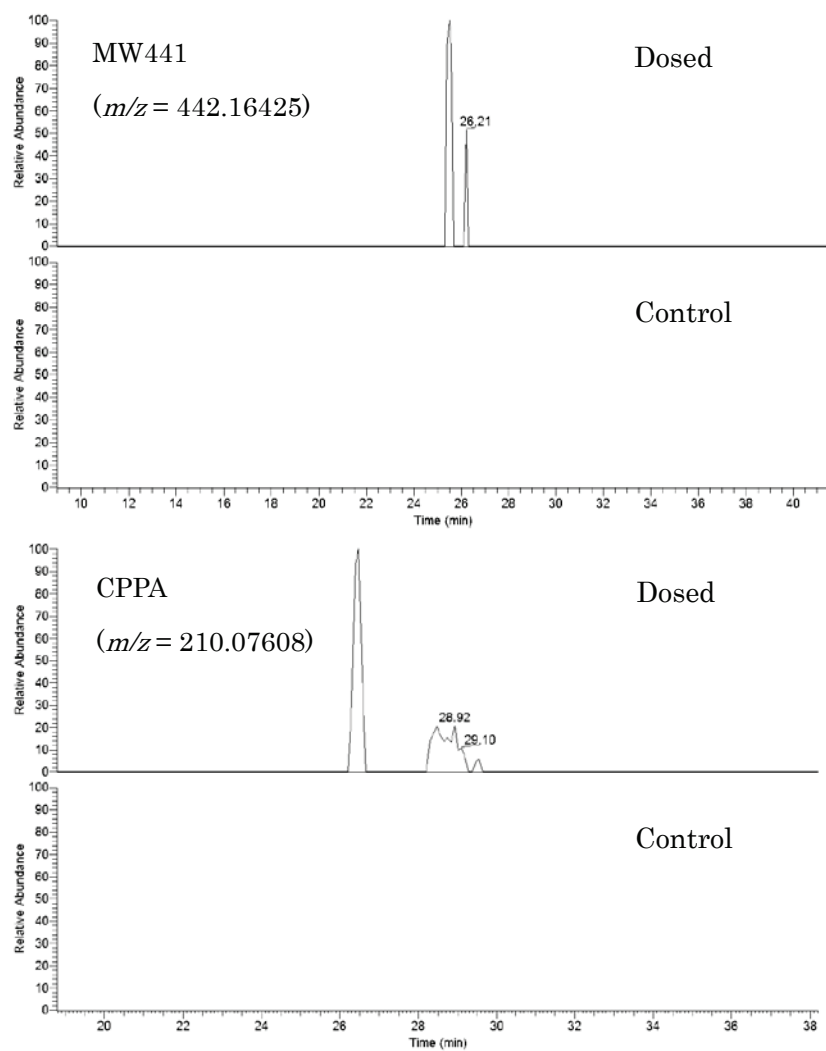


Fig. 12. UV (A) and extracted ion chromatograms (B) of liver homogenate from PXB-mice. FBM were orally administered to PXB-mice at 600 mg/kg and liver samples were collected 2 h after administration. Trace: detected only by MS.

FBM を PXB マウスに投与後の血漿及び肝ホモジネートの LC-UV/MS 分析にて検出された FBM と代謝物のピーク面積値を Table 4 に示す。

Table 4. Comparison of UV peak area of FBM and its metabolites.

(A) Plasma

	CBMA or CCMF	CBMA or CCMF	2OH-FBM or pOH-FBM	2OH-FBM or pOH-FBM	MCF	MW441	CPPA	FBM	MCF- gluc	Nac-OH	Nac- acid
UV Peak Area	329052	161698	596233	1789046	1538782	Trace	Trace	118625182	Trace	2115013	Trace
% of FBM	0.28	0.14	0.50	1.51	1.30	-	-	100	-	1.78	-

(B) Liver

	CBMA or CCMF	CBMA or CCMF	2OH-FBM or pOH-FBM	2OH-FBM or pOH-FBM	MCF	MW441	CPPA	FBM	MCF- gluc	Nac-OH	Nac- acid
UV Peak Area	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace	Trace		N.D.	N.D.	N.D.
% of FBM	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-

FBM were orally administered to PXB-mice at 600 mg/kg and plasma (A) and liver (B) samples were collected 2 h after administration. Trace: detected only by MS. N.D.: not detected.

FBM を投与後の PXB マウス血漿中から検出された代謝物の UV ピーク面積を比較すると、検出されたいずれの代謝物もその割合は FBM の 2%以下であった。また、肝ホモジネートにおいて、代謝物は MS による抽出イオンクロマトグラムでのみ検出され、その生成量はごくわずかであるものと考えられた (Table 4)。

PXB マウスの血漿及び肝ホモジネート中から検出された代謝物のうち、OH-FBM は FBM の酸化代謝により生成する代謝物、MCF は FBM の加水分解代謝により生成する代謝物であり、また CBMA, CCMF, CPPA, MCF-gluc は MCF からの逐次代謝により生成する代謝物であると推定された (Fig. 3)。さらに、MW441 は MCF より生成する反応性代謝物 2-PP が GSH 抱合を受けて生成する代謝物であり、Nac-OH 及び Nac-acid は GSH 抱合体がさらに代謝されて生成する *N*-アセチルシステイン抱合体であると推定された (Fig. 3)。

これらの結果より、FBM を PXB マウスに投与後、PXB マウス中のヒト肝臓において FBM の酸化及び加水分解が起こり、さらに MCF を介して生成する 2-PP が GSH 抱合による解毒代謝を受けるものと考えられた。

II-3-ii) MSI を用いた GSH の変動解析

II-3-i において、FBM を PXB マウスに投与後の血漿及び肝ホモジネートから、2-PP が GSH 抱合を受けて生成する代謝物が複数検出されたことから、FBM の投与がヒトの肝臓に与える影響について解析するため、PXB マウスに FBM を投与後の肝臓における GSH の変動について解析を行った。

FBM を投与後の PXB マウス肝臓を MSI 分析し、FBM 及び GSH の分布を可視化したところ、FBM の投与により GSH が減少傾向を示すことが確認された (Fig. 13)。

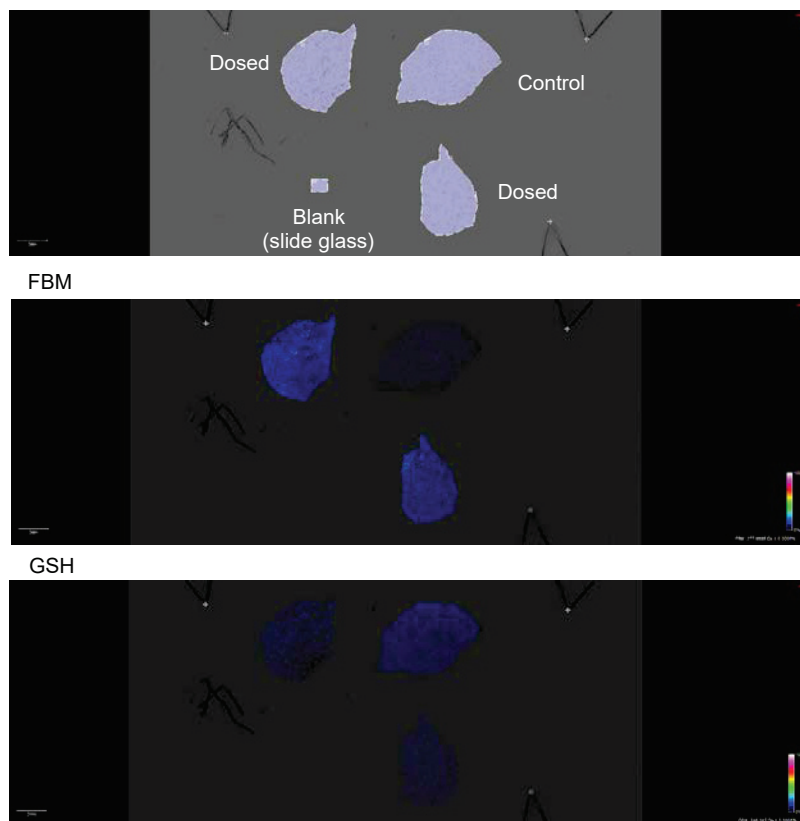
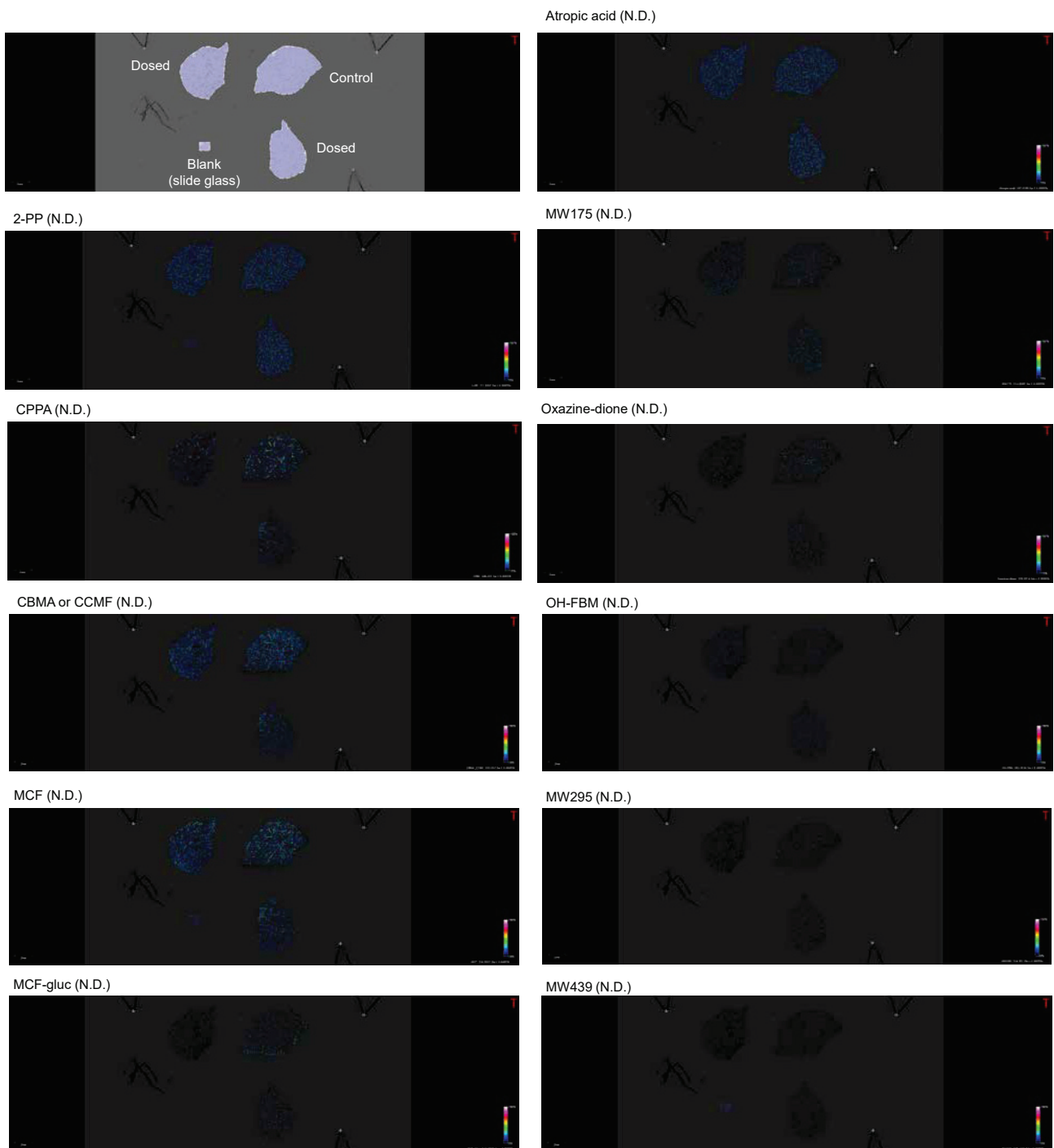


Fig. 13. Visualization of FBM and GSH on liver sections from PXB-mice.

FBM were orally administered to PXB-mice at 600 mg/kg and liver samples were collected 24 h after administration. Distribution of FBM and GSH were analyzed by MSI.

FBM の投与がヒトの肝臓に及ぼす影響についてさらに解析するため、FBM を投与後の FBM 代謝物、また内因性物質として酸化型グルタチオン (GSSG)、さらに内因性 GSH が減少し、GSH 合成が活性化する過程で増加することから、GSH 枯渇のマーカとして知られるオフタルミン酸の変動について解析を行った。

しかしながら、検討を行ったこれらの物質に関しては MSI 分析では検出することができなかつた。(Fig. 14)



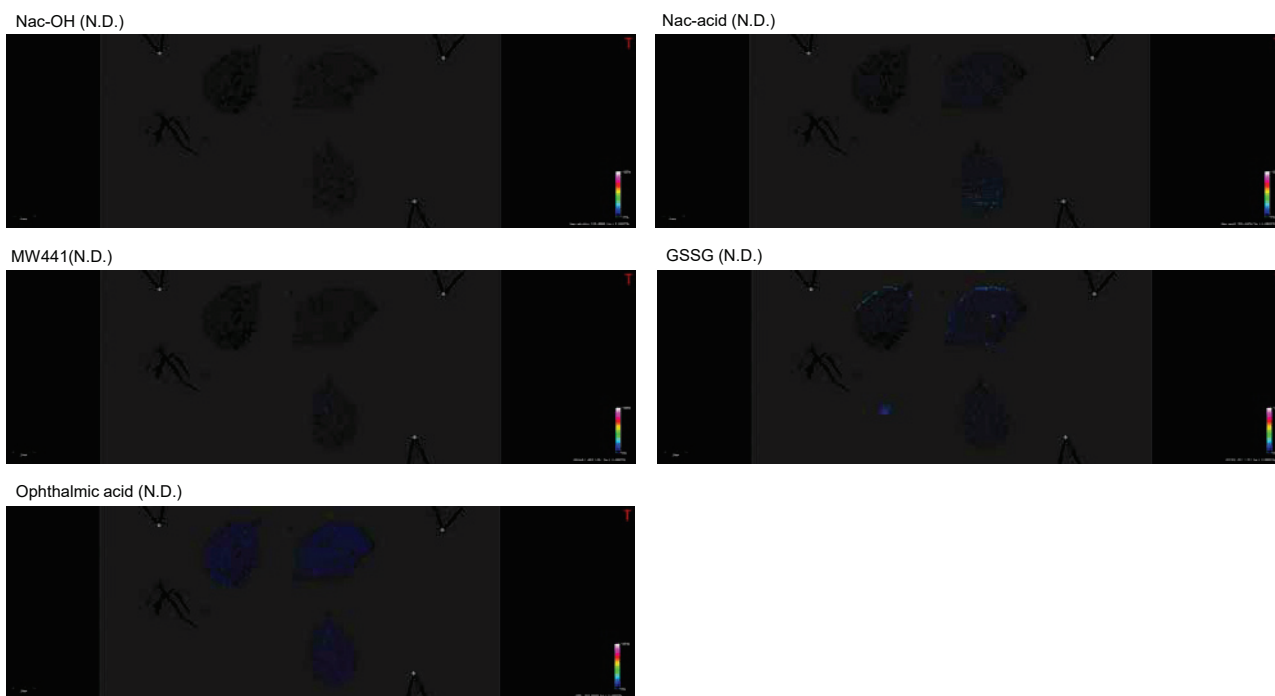


Fig. 14. Visualization of FBM metabolites, GSSG and ophthalmic acid on liver sections from PXB-mice.

FBM were orally administered to PXB-mice at 600 mg/kg and liver samples were collected 24 h after administration. Distribution of FBM metabolites, GSSG and ophthalmic acid were analyzed by MSI. N.D.: not detected.

II-3-iii) FBM を投与後の肝機能パラメーター評価

II-3-ii にて FBM を投与した PXB マウスの血漿を用いて、FBM を投与後の肝機能評価を行った。

血漿中の ALT, AST 及び ALP を測定したところ、いずれのパラメーターもコントロール群と比較して有意な差は認められなかった (Fig. 15)。

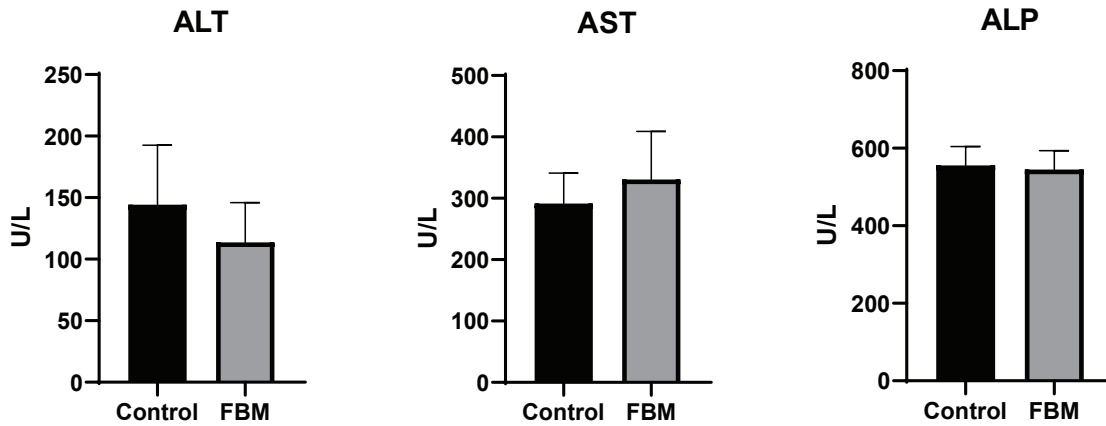


Fig. 15. Plasma ALT, AST and ALP levels after administration of FBM.

FBM were orally administered to PXB-mice at 600 mg/kg and plasma samples were collected 24 h after administration. Data represent the mean \pm SD (n=3).

第4節 小括

本章では、PXB マウスを用いて FBM を投与後の代謝物プロファイルを評価するとともに、FBM の投与がヒトの肝臓に与える影響について検討を行った。

PXB マウスを用いた FBM の代謝物プロファイル評価において、血漿中からは未変化体及び 10 種類の代謝物が検出され (Fig. 11)、肝ホモジネート中からは未変化体及び 7 種類の代謝物が検出された (Fig.12)。これらの代謝物には、FBM の酸化代謝物である OH-FBM、加水分解代謝物である MCF が含まれるとともに、MCF の逐次代謝により生成する CBMA、CCMF, CPPA, MCF-gluc に加えて、2-PP が GSH 抱合を受けて生成する代謝物である MW441、GSH 抱合体がさらに代謝されて生成する *N*-アセチルシステイン抱合体である Nac-OH 及び Nac-acid が含まれていた。

本研究では、マウスやラットを用いた代謝物プロファイルの検討は行っていないため、PXB マウスと実験動物の代謝物プロファイルの種差については十分には検証できていない。従って、種差に関しては今後更なる検討が必要であると考えられるものの、PXB マウスを用いたこれまでの研究において、ヒト特異的代謝物を検出可能であったことが多数報告されている (De Serres et al., 2011 ; Inoue et al., 2009 ; Kamimura et al., 2010 ; Yamazaki et al., 2010)。また、ヒトにおいて、FBM を投与後に尿中に排泄される 2OH-FBM と pOH-FBM の和は投与量の 10%、Nac-OH と Nac-acid の和は投与量の 6.3%であるのに対し、ラットにおいては OH-FBM と pOH-FBM の和が 62%と非常に高く、Nac-OH と Nac-acid の和が 1.1%と低いことが報告されている (Dieckhaus et al., 2000)。本研究において、血漿中から検出された OH-FBM と pOH-FBM の和は FBM に対して 2.01%、Nac-OH と Nac-acid の和は FBM に対して 1.78%と同程度であったことを踏まえると (Table 4 (A))、PXB マウスにおける FBM の代謝物プロファイルは、ヒトに近いものであったと想定される。

本研究では、PXB マウスを用いた *in vivo* 試験においても、反応性代謝物である 2-PP は

検出されなかった (Fig. 11, Fig. 12)。一方で、2-PP が GSH 抱合を受けて生成する代謝物が複数検出された。2-PP の反応性が高いことを踏まえると (Dieckhaus et al., 2001 ; Thompson et al., 1996), 2-PP は生成後に速やかに GSH 抱合による解毒代謝を受けるものと考えられた。

MSI を用いた解析により、FBM を投与後、PXB マウスの肝臓において、内因性 GSH が減少傾向を示すことが確認された (Fig. 13)。この結果より、FBM による肝毒性には 2-PP を解毒代謝する過程で GSH が減少することが関与しているものと考えられた。

FBM の投与が肝臓に及ぼす影響についてさらに解析するため、FBM 代謝物及び GSSG やグルタチオン枯渇マーカーであるオフタルミン酸の検出を試みたところ、いずれの物質も検出されなかった (Fig. 14)。MSI のイオン化法として一般的に用いられている MALDI は、LC-MS で汎用されるイオン化法であるエレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization, ESI) と比較して、低分子化合物の検出感度は低い傾向にある。また、PXB マウスの肝ホモジネートを用いた LC-UV/MS 分析において、FBM 代謝物の量は未変化体と比べてごくわずかであることが確認されている (Table 4)。

こうした点を考慮すると、本研究では MSI 分析において、FBM 代謝物やこれらの内因性物質を検出するのに十分な感度を得られなかったものと考えられる。

肝臓における GSH の減少には、2-PP の抱合代謝による減少に加えて、酸化ストレスの還元により GSH が GSSG に酸化されたことによる減少が関与している可能性が考えられる。本研究においては、酸化ストレスの還元によって増加する GSSG の変化を解析できないため、FBM の投与後に PXB マウスの肝臓で見られた GSH の減少に関して、2-PP の抱合代謝と、酸化ストレスの還元による影響を分離評価できないが、少なくとも、FBM の投与によって生じる GSH の減少が肝毒性の発現に関与しているものと考えられた。

本研究では、PXB マウスの肝臓を MSI 分析することで、FBM の投与により肝臓におい

て GSH が減少することを直接的に評価することが可能であった。肝毒性のメカニズムを解明するにあたり、臨床でヒトの肝臓を用いて GSH の変動を直接評価することは困難であることから、PXB マウスは薬物による肝毒性のメカニズムを解明する上で有用なヒト化動物モデルになるものと考えられた。

また、本研究ではマウス肝細胞の大部分がヒト肝細胞に置換された、高置換 PXB マウスを用いて検討を行った。Sanoh ら (2017) は、ヒト肝細胞の置換率が中程度の PXB マウスを用いて、amiodarone を投与後に内因性リン脂質を MSI 分析し、マウスとヒトにおけるリン脂質の種差を解析したことを報告している。

今後、このようにヒト肝細胞の置換率が中程度の PXB マウスを用いることで、FBM 投与による GSH 変動の種差についても、さらに検討することが可能になるものと考えられる。

FBM を投与後の肝機能パラメーター評価において、ALT, AST, ALP のいずれもコントロール群と比較して有意な差は認められなかった (Fig. 15)。McGee ら (1998) は、FBM を 3000-5000 mg/kg でマウスに単回経口投与した際に、毒性所見は認められなかったこと、また、FBM を 300-600 mg/kg でラット及びイヌに反復経口投与した際に、ALT, AST, ALP の一過性の上昇が認められたものの、肝臓において組織学的な変化は認められなかったことを報告している。

一方で、Kakuni ら (2012) は、ヒトにおいて反応性代謝物に起因する IDT により肝毒性を発症すると考えられている troglitazone を PXB マウスに 1000 mg/kg で 14 日及び 23 日間反復投与したところ、ALT 及び AST の上昇が見られたことを報告している。

こうした情報を踏まえると、PXB マウスは IDT を引き起こす薬剤で肝毒性を発症することが報告されているものの、本研究においては、FBM を投与後に ALT, AST 及び ALP の上昇が認められなかったことから、PXB マウスにおいて FBM の投与による肝毒性は起こっていないものと考えられた。この結果はマウス、ラット及びイヌを用いた McGee ら (1998) の報告と一致するものであると考えられる。

従って、反応性代謝物の生成から肝毒性の発現に至るまでのメカニズムをさらに解明するためには、FBMの投与量上げる、あるいは反復投与をするなど、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

さらに、IDTによる肝毒性には、免疫反応が関与することも報告されている(Park et al., 2005 ; Satoh et al., 1985 ; Walgren et al., 2005)。PXBマウスは免疫不全の性質を有することから、FBMによる肝毒性が免疫反応を介したものである場合、PXBマウスを用いた検討では、肝毒性を検出できない可能性も考えられる。

従って、今後、FBMによる肝毒性の全体像を明らかにしていくためには、反応性代謝物に関する検討に加え、免疫系の関与や、IDTの3つの要因のうち「遺伝的要因」や「環境要因」についても注目し、さらに検討を行う必要があると考えられる。

結論

本研究では、*in vitro* 代謝試験系及び PXB マウスを用いて FBM の反応性代謝物生成メカニズムについて検討を行った。

その結果、以下の知見が得られた。

ヒト CYP 及び CES 発現系ミクロソームを用いた検討から、FBM の酸化代謝に CYP2C8, CYP2C9 及び CYP2E1 が関与し、加水分解代謝に CES1c が関与するものと考えられた。

これらの結果より、CES1c を介した加水分解代謝が 2-PP の生成に関与し、CYP2C8, CYP2C9 及び CYP2E1 を介した酸化代謝が 2-PP の生成を回避する重要な代謝経路となることが示唆された (Fig. 16)。

FBM を PXB マウスに投与後、血漿及び肝臓中から 2-PP が GSH 抱合を受けて生成する代謝物が複数検出された。また、FBM の投与により、肝臓において内因性 GSH が低下することが確認された。これらの結果より、FBM の投与により生成する 2-PP を解毒代謝する過程で GSH が減少することが FBM による肝毒性に関与しているものと考えられた (Fig. 16)。

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モデルであると考えられた。このことから、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。

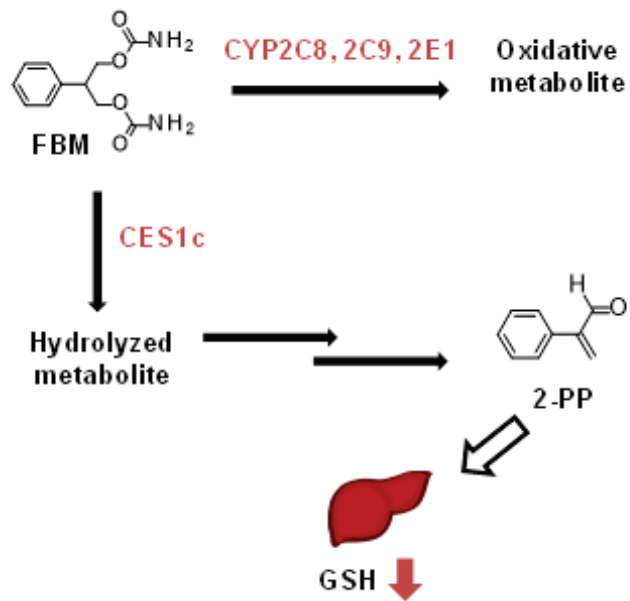


Fig. 16. Postulated mechanisms of reactive metabolite formation and hepatotoxicity by FBM.

論文目録

本博士論文の基礎となる原著論文を以下に示す。

Sato, K., Sanoh, S., Ishida, Y., Tatenno, C., Ohta, S. and Kotake, Y.: Assessment of metabolic activation of felbamate in chimeric mice with humanized liver in combination with in vitro metabolic assays. *J. Toxicol. Sci.*, 2022, in press.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました広島大学大学院医系科学研究科 生体機能分子動態学研究室 古武 弥一郎 教授をはじめ、和歌山県立医科大学薬学部 衛生薬学研究室 佐能 正剛 准教授、太田 茂 教授に深甚たる謝意を表します。

本研究の遂行に際し、格別のご高配を賜りました広島大学大学院医系科学研究科 微生物薬品開発学研究室 黒田 照夫 教授、生薬学研究室 山野 幸子 准教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、数々のご助言、ご指導を賜りました広島大学大学院医系科学研究科 医療薬剤学研究室 高野 幹久 教授、薬効解析科学研究室 森岡 徳光 教授、核酸分析化学研究室 河合 秀彦 准教授に深く感謝致します。

また、本研究の遂行に多大なるご支援、ご協力を頂きました株式会社フェニックスバイオ 立野 知世 博士、石田 雄二 博士に深く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、数多くのご助言をいただきましたアステラス製薬株式会社 長坂 泰久 博士、神山 佳輝 博士をはじめ、株式会社ヘリオス 成富 洋一 博士、千寿製薬株式会社 河村 章生 博士に御礼申し上げます。

参考文献

Adusumalli, V.E., Choi, Y.M., Romanyshyn, L.A., Sparadoski, R.E.Jr., Wichmann, J.K., Wong, K.K., Kucharczyk, N. and Sofia, R.D. (1993): Isolation and identification of 3-carbamoyloxy-2-phenylpropionic acid as a major human urinary metabolite of felbamate. *Drug Metab. Dispos.*, 21, 710-716.

Dalvie, D., Obach, R.S., Kang, P., Prakash, C., Loi, C.M., Hurst, S., Nedderman, A., Goulet, L., Smith, E., Bu, H.Z. and Smith, D.A. (2009): Assessment of three human in vitro systems in the generation of major human excretory and circulating metabolites. *Chem. Res. Toxicol.*, 22, 357-368.

De Serres, M., Bowers, G., Boyle, G., Beaumont, C., Castellino, S., Sigafoos, J., Dave, M., Roberts, A., Shah, V., Olson, K., Patel, D., Wagner, D., Yeager, R. and Serabjit-Singh, C. (2011): Evaluation of a chimeric (uPA^{+/+})/SCID mouse model with a humanized liver for prediction of human metabolism. *Xenobiotica*, 41, 464-475.

Di, L. (2019): The impact of carboxylesterases in drug metabolism and pharmacokinetics. *Curr. Drug Metab.*, 20, 91-102.

Dieckhaus, C.M., Miller, T.A., Sofia, R.D. and Macdonald T.L. (2000): A mechanistic approach to understanding species differences in felbamate bioactivation: relevance to drug-induced idiosyncratic reactions. *Drug Metab. Dispos.*, 28, 814-822.

Dieckhaus, C.M., Santos, W.L., Sofia, R.D. and Macdonald T.L. (2001): The chemistry, toxicology, and identification in rat and human urine of 4-hydroxy-5-phenyl-1,3-oxazaperhydroin-2-one: a reactive metabolite in felbamate bioactivation. *Chem. Res. Toxicol.*, 14, 958-964.

Dieckhaus, C.M., Thompson, C.D., Roller, S.G. and Macdonald, T.L. (2002): Mechanisms of idiosyncratic drug reactions: the case of felbamate. *Chem. Biol. Interact.*, 142, 99-117.

European Medicines Agency (2009): ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals.

https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m3r2-non-clinical-safety-studies-conduct-human-clinical-trials-marketing-authorisation_en.pdf

Food and Drug Administration (2008): Safety Testing of Drug Metabolites. -Guidance for Industry-
<https://www.fda.gov/media/72279/download>

Glue, P., Banfield, C.R., Perhach, J.L., Mather, G.G., Racha, J.K. and Levy, R.H. (1997): Pharmacokinetic interactions with felbamate. In vitro-in vivo correlation. *Clin. Pharmacokinet.*, 33, 214-224.

Goldstein, J.A. (2001): Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 52, 349-355.

Goto, T., Terada, N., Inoue, T., Nakayama, K., Okada, Y., Yoshikawa, T., Miyazaki, Y., Uegaki, M., Sumiyoshi, S., Kobayashi, T., Kamba, T., Yoshimura, K. and Ogawa, O. (2014): The expression profile of phosphatidylinositol in high spatial resolution imaging mass spectrometry as a potential biomarker for prostate cancer. *PLoS One*, 9, e90242.

Hosokawa, M. (2008): Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs. *Molecules*, 13, 412-431.

Inoue, T., Sugihara, K., Ohshita, H., Horie, T., Kitamura, S. and Ohta, S. (2009): Prediction of human disposition toward S-3H-warfarin using chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 24, 153-160.

Ikeda, T. (2015): Recent findings regarding the mechanism of idiosyncratic drug toxicity. *YAKUGAKU ZASSHI*, 135, 567-578

Kakuni, M., Morita, M., Matsuo, K., Katoh, Y., Nakajima, M., Tateno, C. and Yokoi, T. (2012): Chimeric mice with a humanized liver as an animal model of troglitazone-induced liver injury. *Toxicol. Lett.*, 214, 9-18.

Kamimura, H., Nakada, N., Suzuki, K., Mera, A., Souda, K., Murakami, Y., Tanaka, K., Iwatsubo, T., Kawamura, A. and Usui, T. (2010): Assessment of chimeric mice with humanized liver as a tool for predicting circulating human metabolites. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 25, 223-235.

Kapetanovic, I.M., Torchin, C.D., Strong, J.M., Yonekawa, W.D., Lu, C., Li, A.P., Dieckhaus, C.M., Santos, W.L., Macdonald, T.L., Sofia, R.D. and Kupferberg, H.J. (2002): Reactivity of atropaldehyde, a felbamate metabolite in human liver tissue in vitro. *Chem. Biol. Interact.*, 142, 119-134.

Kassahun, K., Pearson, P.G., Tang, W., McIntosh, I., Leung, K., Elmore, C., Dean, D., Wang, R., Doss, G. and Baillie, T.A. (2001): Studies on the metabolism of troglitazone to reactive intermediates in vitro and in vivo. Evidence for novel biotransformation pathways involving quinone methide formation and thiazolidinedione ring scission. *Chem. Res. Toxicol.*, 14, 62-70

Katoh, M., Matsui, T., Nakajima, M., Tateno, C., Kataoka, M., Soeno, Y., Horie, T., Iwasaki, K., Yoshizato, K. and Yokoi, T. (2004): Expression of human cytochromes P450 in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab. Dispos.*, 32, 1402-1410.

Katoh, M., Matsui, T., Okumura, H., Nakajima, M., Nishimura, M., Naito, S., Tateno, C., Yoshizato, K. and Yokoi, T. (2005): Expression of human phase II enzymes in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab. Dispos.*, 33, 1333-1340.

Katoh, M. and Yokoi, T. (2007): Application of chimeric mice with humanized liver for predictive ADME. *Drug Metab. Rev.*, 39, 145-157.

Kaufman, D.W., Kelly, J.P., Anderson, T., Harmon, D.C. and Shapiro, S. (1997): Evaluation of case reports of aplastic anemia among patients treated with felbamate. *Epilepsia*, 38, 1265-1269.

Kawashima, M., Iwamoto, N., Kawaguchi-Sakita, N., Sugimoto, M., Ueno, T., Mikami, Y., Terasawa, K., Sato, T.A., Tanaka, K., Shimizu, K. and Toi, M. (2013): High-resolution imaging mass spectrometry reveals detailed spatial distribution of phosphatidylinositols in human breast cancer. *Cancer Sci.*, 104, 1372-1379.

Kitamura, S., Nitta, K., Tayama, Y., Tanoue, C., Sugihara, K., Inoue, T., Horie, T. and Ohta, S. (2008): Aldehyde oxidase-catalyzed metabolism of N1-methylnicotinamide in vivo and in vitro in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab. Dispos.*, 36, 1202-1205.

Kola, I. and Landis, J. (2004): Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3, 711-715

Martignoni, M., Groothuis, G.M. and de Kanter, R. (2006): Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2, 875-894.

McGee, J.H., Erikson, D.J., Galbreath, C., Willigan, D.A. and Sofia, R.D. (1998): Acute, subchronic, and chronic toxicity studies with felbamate, 2-phenyl-1,3-propanediol dicarbamate. *Toxicol. Sci.*, 45, 225-232.

Nakayama, S., Atsumi, R., Takakusa, H., Kobayashi, Y., Kurihara, A., Nagai, Y., Nakai, D. and Okazaki O. (2009): A zone classification system for risk assessment of idiosyncratic drug toxicity using daily dose and covalent binding. *Drug Metab. Dispos.*, 37, 1970-1997.

Nishidate, M., Hayashi, M., Aikawa, H., Tanaka, K., Nakada, N., Miura, S.I., Ryu, S., Higashi, T., Ikarashi, Y., Fujiwara, Y. and Hamada, A. (2019): Applications of MALDI mass spectrometry imaging for pharmacokinetic studies during drug development. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 34, 209-216.

Nishimura, M., Yoshitsugu, H., Yokoi, T., Tateno, C., Kataoka, M., Horie, T., Yoshizato, K. and Naito, S. (2005): Evaluation of mRNA expression of human drug-metabolizing enzymes and transporters in chimeric mouse with humanized liver. *Xenobiotica*, 35, 877-890.

Ohtsuki, S., Kawakami, H., Inoue, T., Nakamura, K., Tateno, C., Katsukura, Y., Obuchi, W., Uchida, Y., Kamiie, J., Horie, T. and Terasaki, T. (2014): Validation of uPA/SCID mouse with humanized liver as a human liver model: protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-

glucuronosyltransferases by LC-MS/MS. *Drug Metab. Dispos.*, 42, 1039-1043.

Park, B.K., Kitteringham, N.R., Maggs, J.L., Pirmohamed, M. and Williams, D.P. (2005): The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 177-202

Park, B.K., Pirmohamed, M. and Kitteringham, N.R. (1998): Role of drug disposition in drug hypersensitivity: a chemical, molecular, and clinical perspective. *Chem. Res. Toxicol.*, 11, 969-988.

Sanoh, S., Yamachika, Y., Tamura, Y., Kotake, Y., Yoshizane, Y., Ishida, Y., Tateno, C. and Ohta, S. (2017): Assessment of amiodarone-induced phospholipidosis in chimeric mice with a humanized liver. *J. Toxicol. Sci.*, 42, 589-596.

Satoh, H., Gillette, J.R., Davies, H.W., Schulick, R.D. and Pohl, L.R. (1985): Immunochemical evidence of trifluoroacetylated cytochrome P-450 in the liver of halothane-treated rats. *Mol. Pharmacol.*, 28, 468-474.

Shimma, S., Sugiura, Y., Hayasaka, T., Hoshikawa, Y., Noda, T. and Setou, M. (2007): MALDI-based imaging mass spectrometry revealed abnormal distribution of phospholipids in colon cancer liver metastasis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 855, 98-103.

Smith, M.T. (2003): Mechanisms of troglitazone hepatotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, 16, 679-687.

Sugiura, Y. and Setou, M. (2010): Imaging mass spectrometry for visualization of drug and endogenous metabolite distribution: toward in situ pharmacometabolomes. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 5, 31-43.

Sun, N., Fernandez, I.E., Wei, M., Wu, Y., Aichler, M., Eickelberg, O. and Walch, A. (2016): Pharmacokinetic and pharmacometabolomic study of pifrenidone in normal mouse tissues using high mass resolution MALDI-FTICR-mass spectrometry imaging. *Histochem. Cell Biol.*, 145, 201-211.

Takai, N. and Tanaka, Y. (2015): Imaging of drug and metabolite distribution by MS: case studies.

Bioanalysis, 7, 2639-2648.

Taketani, M., Shii, M., Ohura, K., Ninomiya, S. and Imai, T. (2007): Carboxylesterase in the liver and small intestine of experimental animals and human. *Life Sci.*, 81, 924-932.

Tateno, C., Kawase, Y., Tobita, Y., Hamamura, S., Ohshita, H., Yokomichi, H., Sanada, H., Kakuni, M., Shiota, A., Kojima, Y., Ishida, Y., Shitara, H., Wada, N.A., Tateishi, H., Sudoh, M., Nagatsuka, S., Jishage, K. and Kohara, M. (2015): Generation of novel chimeric mice with humanized livers by using hemizygous cDNA-uPA/SCID mice. *PLoS One*, 10, e0142145.

Tettey, J.N., Maggs, J.L., Rapeport, W.G., Pirmohamed, M. and, B.K. (2001): Enzyme-induction dependent bioactivation of troglitazone and troglitazone quinone in vivo. *Chem. Res. Toxicol.*, 14, 965-974.

Thompson, C.D., Kinter, M.T. and Macdonald, T.L. (1996): Synthesis and in vitro reactivity of 3-carbamoyl-2-phenylpropionaldehyde and 2-phenylpropenal: Putative reactive metabolites of felbamate. *Chem. Res. Toxicol.*, 9, 1225-1229.

United States Prescribing Information: felbatol

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/020189s027lbl.pdf

Walgren, J.L., Mitchell, M.D. and Thompson, D.C. (2005): Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.*, 35, :325-361

Yamazaki, H., Kuribayashi, S., Inoue, T., Tateno, C., Nishikura, Y., Oofusa, K., Harada, D., Naito, S., Horie, T. and Ohta, S. (2010): Approach for in vivo protein binding of 5-n-butyl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine bioactivated in chimeric mice with humanized liver by two-dimensional electrophoresis with accelerator mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.*, 23, 152-158.

Yang, J.T., Adusumalli, V.E., Wong, K.K., Kucharczyk, N. and Sofia, R.D. (1991): Felbamate metabolism in the rat, rabbit, and dog. *Drug Metab. Dispos.*, 19, 1126-1134.

山田久陽，山口順一，飯田泉，奥山茂（2006）：特異体質性薬物毒性. 日薬理誌, 127, 473-480.