

薬剤性肝障害発症に関与する反応性代謝物の解明手法に関する研究

Studies for Identification of Reactive Metabolites Related to Drug-Induced Liver Injury

令和4年度 論文博士申請者 長 直樹 (Cho, Naoki)

薬剤性肝障害 (Drug-Induced Liver Injury, DILI) は、非臨床試験での発症の予測が困難であり、多くの患者に使用されて初めて明らかとなる。これまでに報告されている多くの DILI 症例において、薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) により薬物から生成した反応性に富む代謝物 (反応性代謝物) の関与が知られている。反応性代謝物は、核酸やタンパクと共有結合し細胞障害を誘発することで DILI 発症の最初のステップを担う。そのため、DILI の発症原因となる反応性代謝物を同定することは、医薬品の研究開発において重要な課題である。そこで、ヒトにおける DILI の発症原因となる反応性代謝物の解明が求められるが、未だ確立した手法は無い。

高尿酸血症治療薬 benzbromarone (BBR) は、稀に死に至る可能性のある重篤な肝障害を引き起こすことが知られている。複数の反応性代謝物の存在が報告されているが、ヒトにおける DILI の発症原因となる反応性代謝物は明らかとなっていない。そこで本研究では、BBR をモデル薬物として、ヒトにおける DILI の発症原因となる反応性代謝物を非臨床試験により解明することを目的とした。

第一章 BBR の反応性代謝物の同定¹⁾

生体内で生成する反応性代謝物の多くは、肝臓内に 5~10 mM という高濃度で存在する glutathione (GSH) による抱合反応を受け、解毒される。そのため、薬物の反応性代謝物を *in vitro* で解析する方法の一つとして、反応性代

謝物を GSH によってトラップし、安定な GSH 付加体として検出する方法が広く用いられている。

これまでに BBR の主要代謝物の一つである 1'位水酸化体 (1'-Hydroxy BBR) が、*in vitro* 試験において代謝を介した細胞毒性を示し、その細胞毒性は GSH の枯渇により増強することが報告されている。そこで、肝障害の原因となり得る反応性代謝物が 1'-hydroxy BBR から生成するかを明らかにするため、GSH 存在下、1'-hydroxy BBR をヒト肝ミクロソーム (HLM) と反応させたが、GSH 付加体は検出されず、6 位が水酸化された 1',6-dihydroxy BBR の生成が認められた。そこで、1',6-dihydroxy BBR から反応性代謝物が生成するかを明らかにするため、1',6-dihydroxy BBR を合成し、GSH 存在下、HLM と反応させたところ、GSH 付加体 M1、M2 及び M3 の生成が認められた。

次に、各反応に関与する CYP 分子種を、CYP 発現系ミクロソーム及び CYP 特異的阻害剤を用いて同定した。1'-Hydroxy BBR から 1',6-dihydroxy BBR への代謝は主に CYP2C9 により触媒されることが明らかとなった。また、1',6-dihydroxy BBR から M1 の生成は複数の CYP 及び非酵素条件により、M2 の生成は非酵素条件により、M3 の生成は CYP3A4 により触媒されることが明らかとなった。

以上より、1'-hydroxy BBR からの 1',6-dihydroxy BBR の生成を介し複数の反応性代謝物が生成することが示された。また、各代謝過程には、CYP による代謝と非酵素的な反応が関与していることが示された (Fig. 1)。従って、1'-hydroxy BBR から生成する反応性代謝物が、肝細胞毒性発現に関与する可能性が示唆された。

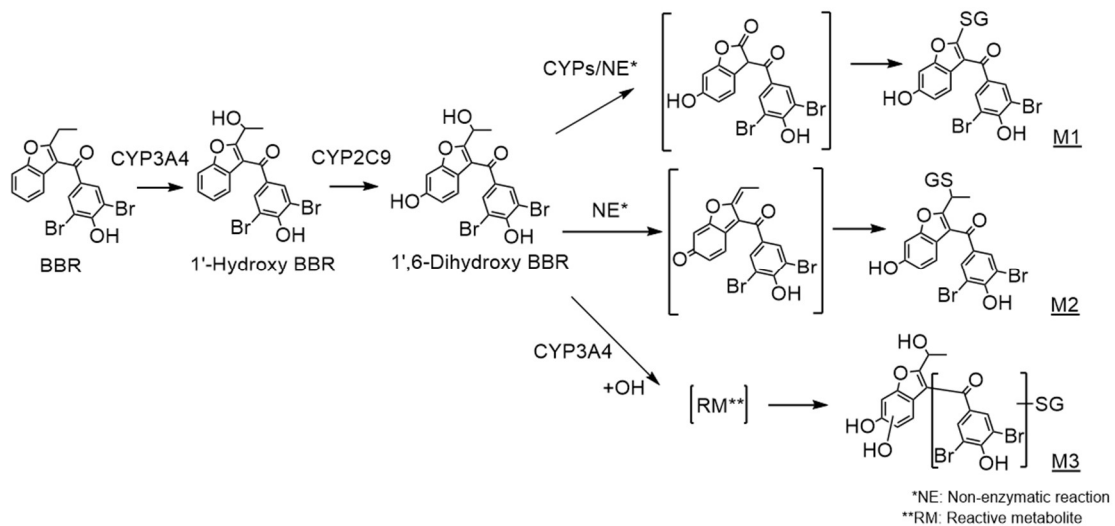


Fig.1. BBR の 1'位及び 6 位水酸化を介した新規代謝活性化経路

第二章 1',6-Dihydroxy BBR から生成する反応性代謝物と肝障害発現との関連性²⁾

BBR は CYP3A4 により 1'-hydroxy BBR へ代謝されることが知られている。また、第一章での検討により 1'-hydroxy BBR から 1',6-dihydroxy BBR へ変換され反応性代謝物が生成されるまでの反応に CYP の関与が示された。そこで、1',6-dihydroxy BBR から生成する反応性代謝物が生体内で肝障害発症に関与するかを明らかにするため、3 種の CYP 誘導剤を前処置したマウス (ICR、雄、7 週令) に BBR を投与し、反応性代謝物の生成が肝機能に及ぼす影響について検討を行った。

まず、マウスにおいて 1',6-dihydroxy BBR の生成量を増加させる CYP 誘導剤を探索するため、phenobarbital (PB)、pregnenolone16 α -carbonitrile (PCN) 及び dexamethasone (DEX) を投与したマウスから調製した肝ミクロソームを用い BBR を代謝させた。その結果、PB、PCN 及び DEX 投与群の肝ミクロソームにおける 1',6-dihydroxy BBR の生成量は、コントロール群と比較し、それぞれ約 1.2 倍、2.0 倍及び 4.0 倍であった。次に、*in vivo* における CYP 誘導剤による BBR の代謝亢進効果を検討するため、PB、PCN 及び DEX を前投与したマウスへ BBR を 400 mg/kg 経口投与し、BBR の血漿中薬物動態

を解析した。その結果、PB、PCN 及び DEX 前処置マウスにおける BBR の血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は、oil 前処置マウス (コントロール) のそれぞれ約 18%、11%及び 24%と、BBR 代謝の亢進が認められた。そこで、BBR 投与 6 時間後の肝臓における GSH 付加体と肝機能検査値を解析した。その結果、肝臓において M2 が検出され、その生成量は、コントロールと比較し、PB、PCN 及び DEX 処置マウスでそれぞれ約 0.34 倍、1.3 倍及び 5.2 倍であった。また、血漿中 alanine amino transferase (ALT) 活性は、DEX 前処置マウスでのみ、BBR 投与前と比較し有意に上昇した (Fig. 2)。

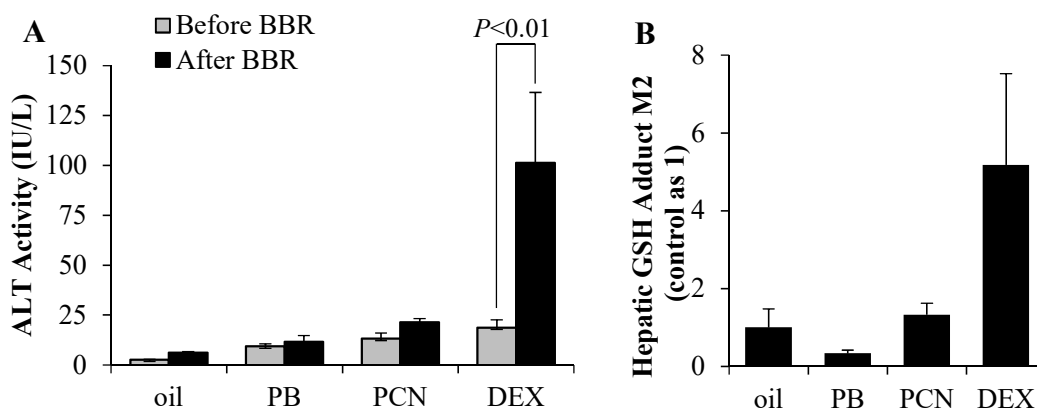


Fig. 2. BBR 投与後の血漿中 ALT 活性 (A)、及び肝における M2 生成量 (B)

以上より、マウスへの DEX 前処置により、BBR から 1',6-dihydroxy BBR への代謝とそれに続く M2 の前駆体である反応性代謝物の代謝生成が亢進し、肝障害を引き起こす可能性が示唆された。

第三章 ヒトにおける BBR 肝障害発現に関与する反応性代謝物の解明³⁾

BBR に関しては、1'位及び 6 位の水酸化を介して生成する反応性代謝物以外に、ベンゾフラン環が酸化され生成するエポキシドや、酸化的脱ハロゲン化により生成するキノン体、イプソ置換を介して生成する 2,6-dibromo-*p*-benzoquinone (DBBQ) 及び 2,6-dibromohydroquinone (DBH) といった複数の反応性代謝物が報告されている。これら反応性代謝物は *in vitro* 試験系や非臨床動物実験において生成が認められているが、ヒト生体内での生成は明ら

かとなっていない。そこで本章では、ヒト生体内で生成する反応性代謝物を明らかにするため、肝臓の95%以上がヒト由来肝へ置換されたマウス（ヒト肝キメラマウス）を用い検討を行った。

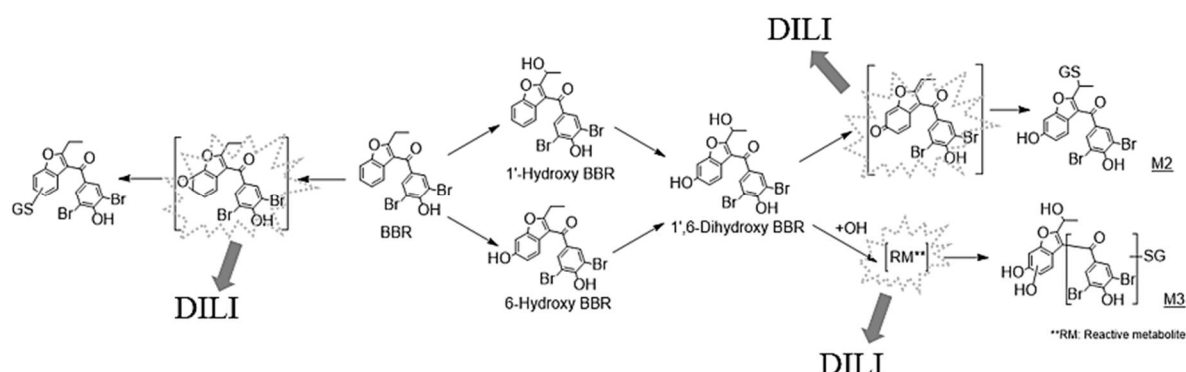
ヒト肝細胞を移植したマウスは、様々な薬物でヒトと同様の薬物代謝プロファイルを示す有用なツールとして知られている。そこでまず、TK-NOG マウス（コントロール、雄、12-13 週齢）及び TK-NOG マウスの内因性肝細胞をヒト肝細胞に置換したマウス（ヒト肝キメラマウス、雄、15-16 週齢）へ BBR を 20 mg/kg 経口投与し、BBR、主要代謝物 1'-hydroxy BBR 及び 6-hydroxy BBR の薬物動態パラメータとヒト既報値⁴⁾を比較した。その結果、BBR 及び代謝物の AUC 比 (BBR: 1'-Hydroxy BBR: 6-Hydroxy BBR) は、コントロールにおいて 1: 0.2: 2.8 であったのに対し、ヒト肝キメラマウスでは 1: 1.2: 0.7 であった。ヒト肝キメラマウスにおける BBR 及び代謝物の AUC 比が、ヒトにおける AUC 比 (1: 0.9: 0.7) とよく一致したことから、ヒト肝キメラマウスはヒトにおける BBR の薬物動態を再現すると考えられた。

次に、BBR を投与したヒト肝キメラマウスの血漿、肝臓、尿を用いて、生体内における GSH 付加体の解析を行った。その結果、BBR の 1'位及び 6 位の水酸化を介して生成する複数の GSH 付加体 (M2 及び M3 を含む) と、ベンゾフラン環への GSH 付加体が検出された。ベンゾフラン環への GSH 付加体の前駆体 (反応性代謝物) は、過去の報告より、ベンゾフラン環が酸化されたエポキシドと推定された。これら反応性代謝物の GSH 付加体とその更なる代謝物は、コントロールと比較し、ヒト肝キメラマウスの組織中において高い生成量を示したことから、マウスへ移植したヒト肝細胞においてこれら反応性代謝物が生成したと考えられた。

以上より、1'位及び 6 位の水酸化並びにベンゾフラン環のエポキシ化を介し生成する反応性代謝物が *in vivo* 環境内のヒト肝細胞において生成したこ

とから、これら反応性代謝物はヒト生体内においても生成し、DILI 発症に關与すると考えられた (Fig. 3)。

Fig. 3. ヒト生体内における BBR の反応性代謝物の推定生成経路



総括

本研究では、BBR の新規反応性代謝物を同定し、その反応性代謝物のヒト生体内における生成と DILI 発症への関与を示唆した。これにより、本研究で用いた一連の手法が、DILI 発症原因となる反応性代謝物の同定に有用であることを示した。

本研究の成果は、開発中の候補医薬品や上市済みの医薬品による DILI の発症原因となる反応性代謝物の同定の迅速化に繋がるものであり、より安全な医薬品の開発に貢献できると考えられる。

《 参考文献 》

- 1) Cho N., Kobayashi K., Yoshida M., Kogure N., Takayama H., Chiba K., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **32**, 46-52 (2017).
- 2) Yoshida M., Cho N., Akita H., Kobayashi K., *J Biochem. Mol. Toxicol.*, **31**, e21946 (2017).
- 3) Cho N., Suemizu H., Kamimura H., Ohe T., Ito F., Akita H., Kobayashi K., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **47**, 100467 (2022).
- 4) De Vries JX., Walter-Sack I., Ittensohn A., Weber E., Empl H., Gresser U., Zollner N., *Clin. Invest.*, **71**, 947-952 (1993).