

学位論文要旨

抗炎症薬 nabumetone の薬物代謝に関する研究

2020年3月

松本かおり

抗炎症薬 nabumetone の薬物代謝に関する研究

序論

医薬品開発において、薬物動態学的特性は血中濃度と有効性/毒性を決定する重要な因子である。臨床現場で使用される医薬品の体内からの消失は、代謝過程が約 70%を占める [1]。また、一般に臨床的に問題となる薬物相互作用の大半は薬物代謝によるものであり [2]、薬物相互作用を予測・回避するためには医薬品の代謝反応を担う酵素を特定することが必要である。

非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)である nabumetone[4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)butan-2-one] は、消化管副作用の軽減を目的とした非酸性のプロドラッグである。Nabumetone は生体内で芳香環の 4 位の炭素鎖中の 2 個の炭素が酸化的に除去されて活性体 6-methoxy-2-naphthylacetic acid (6-MNA) に変換されて薬効を発揮する。6-MNA は脱メチル化されて 6-hydroxy-2-naphthylacetic acid (6-HNA) となって不活化し、一部はさらに抱合を受けて尿中に排泄される (Fig. 1) [3]。ヒトに ¹⁴C-nabumetone を経口投与した場合、48 時間以内に投与量の約 70%が尿中に排泄され、尿中代謝物の約 58%が 6-MNA と 6-HNA およびそれらの抱合体であったことが報告されている [3]。

また、nabumetone は 6-MNA に活性化される経路以外に、炭素鎖中のケトンが 2 級アルコールに還元され 4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)butan-2-ol (MNBO) となる非活性化経路と 6-methoxy 基が脱メチル化されて 4-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)butan-2-one (M3) になる非活性化経路があることがわかっている。

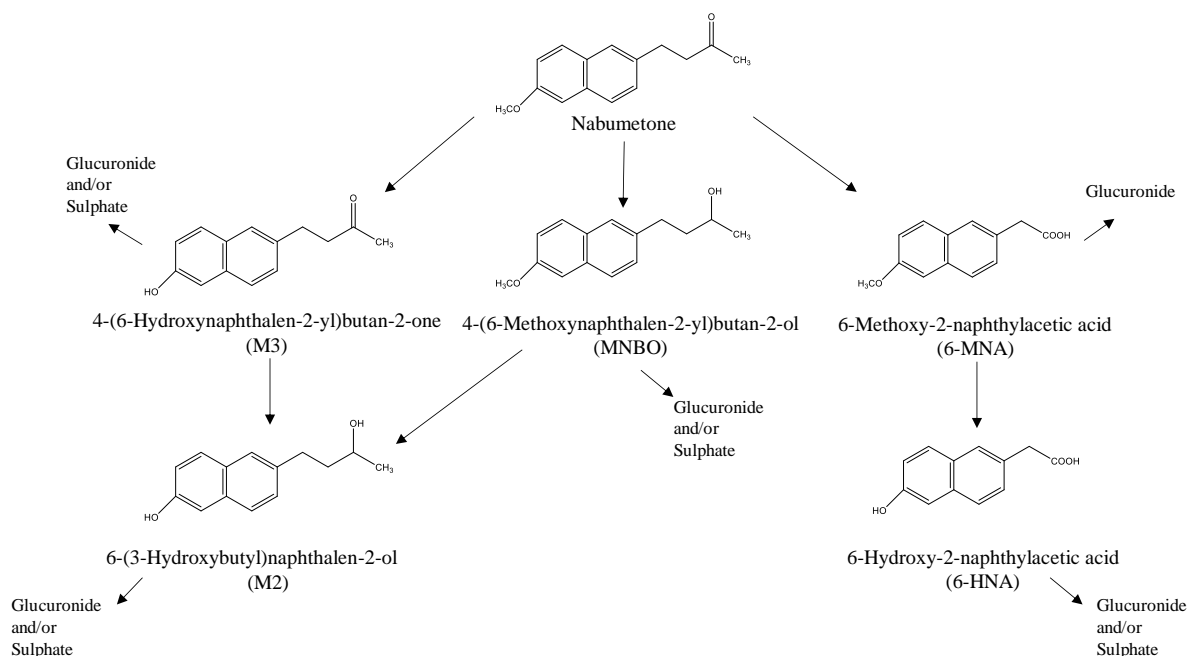


Fig. 1 Known metabolic pathways of nabumetone.

Nabumetone の医薬品としての有効性と安全性を確保するには、nabumetone の複数の代謝経路

に關与するシトクロム P450 (CYP) や CYP 以外 (non-CYP) の複数の代謝酵素に關する薬物動態学的特性を詳細に把握することが重要であるが、これらの情報は十分に明らかにされていない。本研究では nabumetone の代謝特性を、ヒト肝細胞画分、ヒト代謝酵素発現系およびヒト凍結遊離肝細胞、また一部ラット肝細胞画分およびラット代謝酵素発現系を用いて種々条件で *in vitro* 代謝実験により評価した。一連の研究で得られる情報は、酸化、還元、抱合などの複数の代謝過程を有する nabumetone の臨床での適正使用に貢獻することが期待される。

第 1 章 Nabumetone から活性代謝物 6-MNA への酸化的代謝に關する検討

Nabumetone から 6-MNA への代謝に關する経路とそれに関与する酵素について、複数の異なる結果が報告されている。Turpeinen らは nabumetone から 6-MNA の生成には CYP が關与しており、主に CYP1A2 が触媒すると報告している [4]。Nobilis ら [5] や Varfaj ら [6] は、6-MNA が nabumetone の 3-ヒドロキシ体である 3-hydroxyl-4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)butan-2-one (3-OH-NAB) を經由して生成すると報告している。一方、Fiorentini ら [7] はヒトフラビン含有モノオキシゲナーゼ 5 (FMO5) が、nabumetone の側鎖カルボニル基の隣に酸素原子が挿入されたエステル体 2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)ethyl acetate (6-MNEA) へ変換する Baeyer-Villiger 酸化に關与し、6-MNEA が nabumetone から 6-MNA への中間代謝物であると推察している (Fig. 2)。このように、nabumetone から 6-MNA の変換は何らかの中間体を經由する可能性が示唆されているが、詳細は不明のままである。第 1 章では、nabumetone から 6-MNA に至る活性化経路の代謝反応特性を明らかにするために、1) nabumetone から 6-MNEA を介した 6-MNA への経路、および 2) nabumetone から 3-OH-NAB を介した 6-MNA への経路について *in vitro* 代謝実験でアプローチした。

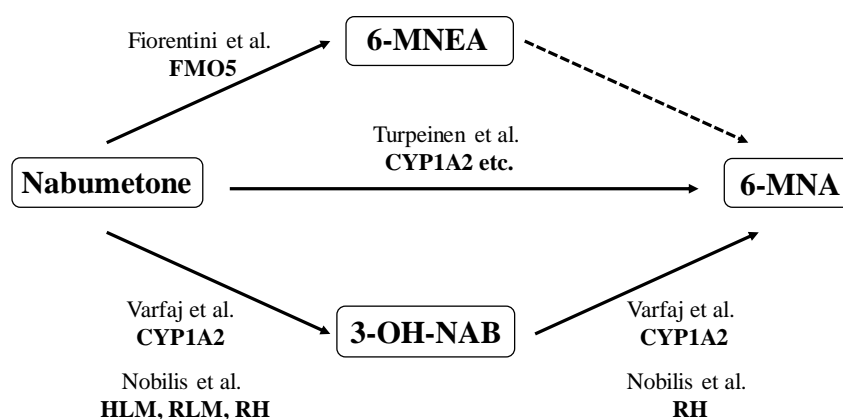


Fig. 2 Representative studies of nabumetone metabolism.

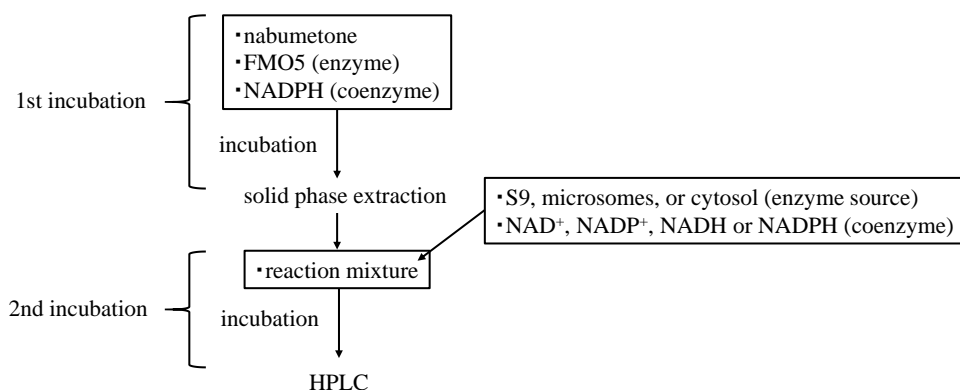
HLM: human liver microsomes, RLM: rat liver microsomes, RH: rat hepatocytes

1) Nabumetone から 6-MNEA を介した 6-MNA への経路に關する検討

Nabumetone から 6-MNA への変換は、ヒト凍結遊離肝細胞を用いた *in vitro* 代謝実験でのみ觀察されたことから、補酵素が異なる複数の酵素が關与していることが示唆された。ヒト FMO5 発

現系マイクロソームを用いて nabumetone の代謝実験を行ったところ、nabumetone のエステル体である 6-MNEA の生成が観察された。FMO1 および FMO3 発現系マイクロソームでは 6-MNEA の生成が観られなかったことから、FMO5 に特異的な反応であることが示唆された。また、Baeyer-Villiger monooxygenase の基質である 4-methoxyphenylacetone (4-MP-one) が nabumetone から 6-MNEA への生成を低減させたことから、4-MP-one は Baeyer-Villiger 酸化を触媒する FMO5 の阻害剤となり得ることが明らかとなった。

さらに、6-MNEA から 6-MNA への経路について検討するために、種々酵素源を用いて 2 段階の代謝実験 (2 段階インキュベーション) を行い検討した (Scheme 1)。ヒト FMO5 発現系マイクロソームを用いた nabumetone の *in vitro* 代謝実験 (1st incubation) を行い、酵素源と補酵素を除去するために固相抽出を行った後、その代謝反応液にヒト肝 S9 と補酵素 NAD⁺を加えて代謝実験 (2nd incubation) を行った結果、6-MNA の生成が確認された。このことから、6-MNEA は nabumetone から 6-MNA の変換過程における中間代謝物であり、ヒト FMO5 が 6-MNA への変換において重要な役割を担う分子種であることが確認された。さらに、ヒト FMO5 発現系マイクロソームを用いて nabumetone の *in vitro* 代謝実験を行った反応液 (1st incubation) に、ヒト肝 S9、補酵素 NAD⁺および各種阻害剤を加えて阻害実験 (2nd incubation) を行ったところ、alcohol dehydrogenase (ADH)、aldehyde dehydrogenase (ALDH) および carboxylesterase (CES) の関与が明らかとなった。以上より、nabumetone はまずヒト肝マイクロソーム画分に存在する FMO5 によりエステル体となり、次いで加水分解されてアルコール体となり、さらにヒト肝サイトゾル画分の ADH によりアルデヒド体となった後に、ALDH により 6-MNA になることが判明した。



Scheme 1 Procedure of *in vitro* metabolism of the incubation products of nabumetone by FMO5 with human liver S9, microsomes or cytosol under various incubation conditions (2 step incubation).

2) Nabumetone から 3-OH-NAB を介した 6-MNA への経路に関する検討

Nabumetone から 3-OH-NAB への変換は、ヒト CYP 発現系マイクロソームを用いた *in vitro* 代謝実験より、CYP2B6、CYP2C19 および CYP3A4 が関与していることが明らかとなった。3-OH-NAB から 6-MNA への変換は、ヒト凍結遊離肝細胞を用いた *in vitro* 代謝実験でのみ観察されたことから、nabumetone から 6-MNA への変換と同様に、補酵素が異なる複数の酵素が関与していることが

示唆された。3-OH-NAB は化学構造的に nabumetone と同じく炭素鎖中にケトンを有する。そこで、nabumetone と共通の構造を一部有する 3-OH-NAB についても、ヒト FMO とヒト肝 S9 の 2 段階インキュベーションを行った。ヒト FMO 発現系ミクロソームを用いた 3-OH-NAB の 1st incubation の後、ヒト肝 S9 と補酵素 NAD⁺を加えて 2nd incubation を行った結果、6-MNA の生成はヒト FMO1 および FMO3 では観察されなかったが、ヒト FMO5 では確認された。さらに、ヒト FMO5 による 1st incubation 反応液とヒト肝 S9 による 2nd incubation 反応液に各種阻害剤を加えて阻害実験を行ったところ、3-OH-NAB から 6-MNA への変換には、ALDH および何らかの加水分解酵素の関与が明らかになった。さらに、ヒト FMO5 による 3-OH-NAB の 1st incubation 反応液に HPLC 用アルデヒドラベル化試薬を添加したところ、アルデヒド体が検出された。以上より、nabumetone は CYP により 3-OH-NAB に変換された後、FMO5 によりエステル体となり、次いで加水分解されてアルデヒド体となり、さらに ALDH により 6-MNA となることが明らかとなった。

第 2 章 活性代謝物 6-MNA の不活化代謝に関する検討

Nabumetone の活性代謝物 6-MNA は、6-HNA への 6-O-脱メチル化が主要な不活化経路であると示唆されている。第 2 章では、6-MNA から 6-HNA への 6-O-脱メチル化に関与する酵素を同定するために *in vitro* 代謝実験を行った。また、ヒトとラットの種差について検討した。さらに、ヒトにおける遺伝子多型の影響についても検討した。

ヒト CYP 発現系ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝実験、各 CYP 分子種の阻害剤および阻害抗体による阻害実験の結果より、ヒトにおける 6-MNA から 6-HNA への不活化に、CYP2C9 が関与していることが明らかになった。同様にラットについて検討した結果、ラットにおける 6-MNA の不活化代謝に関与する主要な CYP 分子種は CYP2C6 および CYP2C11 であることが判明した。この不活化代謝に関する酵素キネティックパラメータをヒトとラットで比較したところ、ヒト肝ミクロソームにおける 6-HNA 生成の見かけの K_m 値および V_{max} 値はラット肝ミクロソームのこれらの値と類似しており、ヒトとラット間で V_{max}/K_m 値に著しい種差は観察されなかった。

ヒトにおける 6-MNA から 6-HNA への不活化は CYP2C9 が関与することが判明したことから、さらに CYP2C9 の遺伝子多型の影響を検討するために、野生型、変異型の発現系ミクロソームおよび遺伝子の遺伝子型が決定された個別ミクロソームを用いて *in vitro* 代謝実験を行った。発現系ミクロソームを用いた代謝実験では、6-MNA の 6-O-脱メチル化の固有クリアランスが、野生型に比べて Leu359 変異型では有意に低かったが、Cys144 変異型では変わらなかった。個別ヒト肝ミクロソームを用いた代謝実験では、Leu359 ホモ接合体の固有クリアランスは他の試料と比べて低かったが、Leu359 ヘテロ接合体では測定した他の試料の活性範囲内であった。野生型と比べて Leu359 ホモ接合体の固有クリアランスは低値を示したが、ホモ型 Leu359 アレルの出現頻度は極めて稀であることから、臨床上問題となることは少ないと推察した。

第 3 章 Nabumetone の非活性化代謝に関する検討

Nabumetone が活性代謝物 6-MNA に変換されることなく消失する非活性化代謝は、炭素鎖中の

ケトンが2級アルコールに還元され MNBO となる経路と 6-methoxy 基が *O*-脱メチル化されて M3 になる経路の2つが存在する。第3章では、これらの経路に関与する酵素を同定するために、*in vitro* 代謝実験を行い検討した。

1) Nabumetone から MNBO への変換に関する検討

Nabumetone から MNBO への NADPH 依存的な還元代謝は、阻害実験と相関性の検討により、ヒト肝ミクロソーム中では 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) が触媒することが判明した。また、ヒト肝サイトゾル中では複数の酵素が関与するが、特に aldo-keto reductase 1C4 (AKR1C4) が主要な役割を果たしていることが明らかとなった。

2) Nabumetone から M3 への変換に関する検討

Nabumetone から M3 への *O*-脱メチル化は、ヒト CYP 発現系ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝実験、各 CYP 分子種の阻害抗体による阻害実験、および Silensomes™を用いた *in vitro* 代謝実験の結果から、複数の CYP が関与し、なかでも CYP2C9 の寄与率が最も高いことが明らかになった。

結論

Nabumetone の代謝特性を種々条件の *in vitro* 代謝実験で評価したところ、nabumetone の代謝には複数の経路が存在し、これらには複数の代謝酵素が関与していることが判明した。また、代謝酵素には CYP 以外の複数の non-CYP 代謝酵素が関与していることが明らかになった (Fig. 3)。特に nabumetone の活性化には、FMO5 による Baeyer-Villiger 反応が関与し、これが活性化代謝のエントリーポイントとなることを見出した。

一般に生体内の薬物代謝は CYP の寄与が大きく、臨床では CYP が関与する薬物相互作用、遺伝子多型による薬物動態の個人差が問題となることが多い。そのため、近年の医薬品開発では CYP で代謝されず、non-CYP で消失するリード化合物が選択される傾向が強くなっている。しかし、CYP と比較して non-CYP の情報は少ない。なかでもヒト FMO5 の基質特異性はほとんど解明されておらず、また、阻害剤も知られていないため代謝酵素を特定することはこれまでは困難であった。本研究で得られた nabumetone の代謝経路および代謝酵素に関する新たな知見は、これを医療現場に添付文書やその他の手段を通じて提供することにより、nabumetone の適正使用のために有用な情報となると考える。さらに、本研究の一連の代謝実験で新たに考案した2段階インキュベーション法および non-CYP 代謝酵素である FMO5 の阻害剤の発見は、複数の代謝酵素が関与する代謝反応の中間代謝物の特定および non-CYP 代謝酵素の特定方法の確立に寄与するものとする。

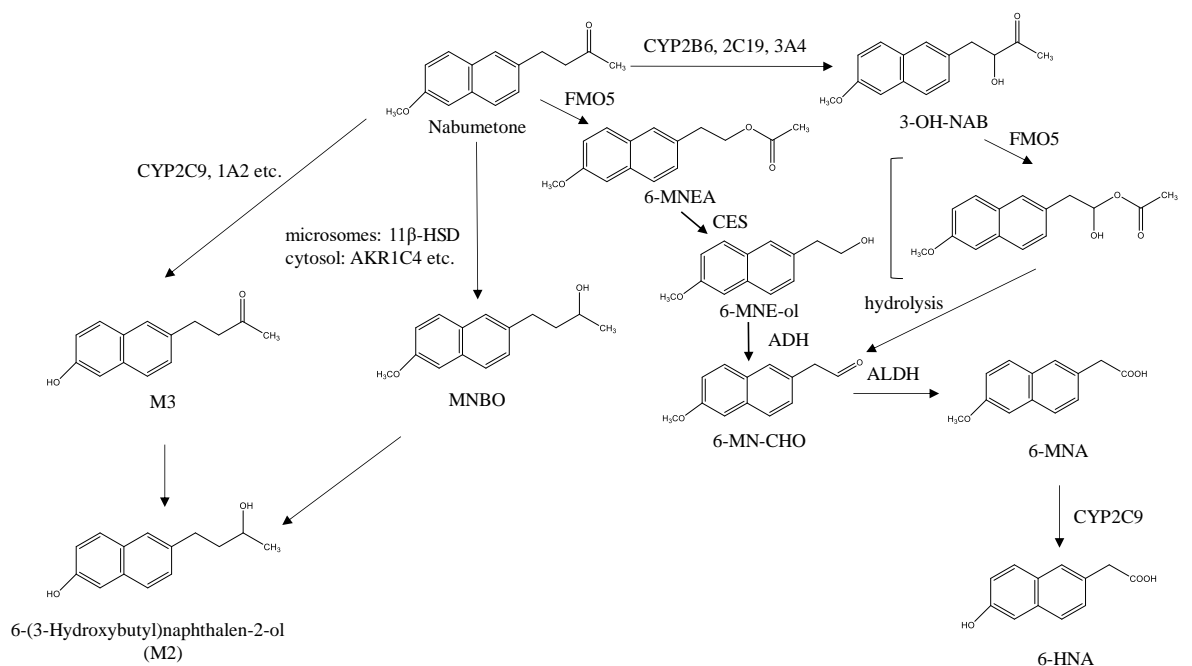


Fig. 3 Proposed metabolic pathways of nabumetone in human.

引用文献

- Williams J. A., Hyland R., Jones B. C., Smith D. A., Hurst S., Goosen T. C., Peterkin V., Koup J. R., Ball S. E., Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 1201-1208 (2004).
- 千葉 寛 チトクローム P450 を介した薬物相互作用. *ファルマシア*, **31**, 992-996 (1995).
- Haddock R. E., Jeffery D. J., Lloyd J. A., Thawley A. R., Metabolism of nabumetone (BRL 14777) by various species including man. *Xenobiotica*, **14**, 327-337 (1984).
- Turpeinen M., Hofmann U., Klein K., Mürdter T., Schwab M., Zanger U. M., A predominate role of CYP1A2 for the metabolism of nabumetone to the active metabolite, 6-methoxy-2-naphthylacetic acid, in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, **37**, 1017-1024 (2009).
- Nobilis M., Mikušek J., Szotáková B., Jirásko R., Holčápek M., Chamseddin C., Jira T., Kučera R., Kuneš J., Pour M., Analytical power of LLE-HPLC-PDA-MS/MS in drug metabolism studies: identification of new nabumetone metabolites. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **80**, 164-172 (2013).
- Varfaj F., Zulkifli S. N., Park H. G., Challinor V. L., De Voss J. J., Ortiz de Montellano P. R., Carbon-carbon bond cleavage in activation of the prodrug nabumetone. *Drug Metab. Dispos.*, **42**, 828-838 (2014).
- Fiorentini F., Romero E., Fraaije M. W., Faber K., Hall M., Mattevi A., Baeyer-Villiger Monooxygenase FMO5 as Entry Point in Drug Metabolism. *ACS Chem. Biol.*, **12**, 2379-2387 (2017).