

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

目次

略語一覧	i
序論	1
第1章 Nabumetone から活性代謝物 6-methoxy-2-naphthylacetic acid (6-MNA) への酸化的代謝に関する検討	4
第1節 緒言	4
第2節 実験材料と実験方法	8
第3節 結果・考察	22
3-1 Nabumetone から 2-(6-methoxy naphthalen-2-yl)ethyl acetate (6-MNEA) を介した 6-MNA への変換に関する検討	22
3-2 Nabumetone から 3-hydroxyl-4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)butan-2-one (3-OH-NAB) を介した 6-MNA への変換に関する検討	30
第4節 小括	39
第2章 活性代謝物 6-MNA の不活化代謝に関する検討	42
第1節 緒言	42
第2節 実験材料と実験方法	44
第3節 結果・考察	55
3-1 6-MNA から 6-hydroxy-2-naphthylacetic acid (6-HNA) への変換に関する検討	55
3-2 6-MNA から 6-HNA への変換における遺伝子多型の影響に関する検討	64
第4節 小括	69
第3章 Nabumetone の非活性化代謝に関する検討	71
第1節 緒言	71
第2節 実験材料と実験方法	73
第3節 結果・考察	85
3-1 Nabumetone から 4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)butan-2-ol (MNBO) への変換に関する検討	85
3-2 Nabumetone から 4-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)butan-2-one (M3) への変換に関する検討	92
第4節 小括	99
総括	100

謝辭	104
参考文献	106
付録 1	115
付録 2	118
主論文目録	120

略語一覽

3-OH-NAB	3-hydroxyl-4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)butan-2-one
4-MP	4-methylpyrazole
4-MP-one	4-methoxyphenylacetone
5-FU	5-fluorouracil
6-HNA	6-hydroxy-2-naphthylacetic acid
6-MN	6-methoxy-2-naphthaldehyde
6-MNA	6-methoxy-2-naphthylacetic acid
6-MN-CHO	2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)acetaldehyde
6-MN-diol	1-(6-methoxynaphthalen-2-yl)butane-2,3-diol
6-MNEA	2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)ethyl acetate
6-MNE-ol	2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)ethan-1-ol
11 β -HSD	11 β -hydroxysteroid dehydrogenase
α -NF	α -naphthoflavone
AADAC	arylamide deacetylase
AEBSF	4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
ADH	alcohol dehydrogenase
AKR	aldo-keto reductase
ALDH	aldehyde dehydrogenase
AO	aldehyde oxidase
AP	allopurinol
BA	barbituric acid
BNPP	<i>bis</i> (<i>p</i> -nitrophenyl) phosphate
BVMO	Baeyer-Villiger monooxygenase
CDCA	5 β -cholanic acid-3 α ,7 α -diol
cDNA	complementary DNA
CES	carboxylesterase
CL_{int}	intrinsic clearance
COSY	correlation spectroscopy
CRB	carbonyl reductase
CYP	cytochrome P450
DBD-H	4-(<i>N,N</i> -dimethylaminosulphonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole
DETC	diethyldithiocarbamate
DF	disulfiram
DM	dicumarol
DPD	dihydropyrimidine dehydrogenase
EA	ethacrynic acid

EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FA	flufenamic acid
FMO	flavin-containing monooxygenase
FUR	furafylline
G-6-P	glucose-6-phosphaste
G-6-P DH	glucose-6-phosphaste dehydrogenase
GA	18 β -glycyrrhetic acid
GC/MS	gas chromatography mass spetrometry
HPLC	high-performance liquid chromatography
HZ	hydralazine hydrochloride
IC ₅₀	half maximal (50%) inhibitory concentration
I.D.	inner diameter
I.S.	internal standard
IV	isovanillin
KCZ	ketoconazole
<i>K_i</i>	inhibition constant
<i>K_m</i>	Michaelis constant
M2	6-(3-hydroxybutyl)naphthalen-2-ol
M3	4-(6-hydroxy-2-naphthyl)butan-2-one
MAO	monoamine oxidase A
MBI	mechanism based inhibitor
mCPBA	<i>m</i> -chloroperoxybenzoic acid
MD	menadione
MK	montelukast
MNBO	4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)butan-2-ol
MPA	medroxyprogesterone acetate
MTPA	α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetyl
MTZ	methimazole
NAD ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form)
NADP ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized form)
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form)
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
NAT	<i>N</i> -acetyltransferase
NBI	<i>N</i> -benzylimidazole
N-BN	(<i>S</i>)-(+)- <i>N</i> -3-benzylirvanol
NMR	nuclear magnetic resonance
NSAIDs	non-steroidal anti-inflammatory drugs
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride

PP	phenolphthalein
PON	paraoxonase
PZ	pyrazole
QC	quercetin
<i>Qh</i>	hepatic blood flow
QUIN	quinidine
r^2	decision coefficient
RAF	relative activity factor
rpm	revolutions per minute
S.D.	standard deviation
SFK	sulfaphenazole
SKF525A	α -phenyl- α -propylbenzeneacetic acid 2-(diethylamino)ethyl ester
S-MF	<i>S</i> -mephénytoin
SULT	sulfotransferases
TAM	troleandomycin
TICP	ticlopidine
Tris	<i>tris</i> (hydroxymethyl)aminomethane
UGT	UDP-glucuronosyltransferase
UV	ultraviolet detection
V_{max}	maximum velocity

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（米国の処方数トップ 200 の医薬品）の体内からの消失は、代謝過程が約 70%を占める [1]。また、医薬品代謝の約 70%はシトクロム P450 (CYP) によるもので、CYP 以外の酵素 (non-CYP 代謝酵素) の寄与はグルクロン酸抱合酵素 (UGT)、エステラーゼ、フラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO)、アセチル抱合酵素 (NAT)、モノアミンオキシダーゼ (MAO) の順とされているが、CYP と比較してその関与は少ない [1]。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, 3]、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。

個々の患者の薬物動態は、遺伝子多型や疾病などの内的要因と薬物相互作用や生活習慣などの外的要因により変動する。CYP は多くの医薬品の代謝酵素であるため、これらの要因が CYP 代謝に及ぼす影響について、膨大な研究とデータの蓄積が行われてきた。また、臨床の間では CYP に関わる薬物相互作用、もしくはその関与が疑われる事例が多数報告されてきた。テルフェナジンやアステミゾールは、CYP が関与する薬物相互作用が原因で市場から撤退することになった医薬品である [4, 5]。近年は CYP の酵素分子種の同定方法 [6] や薬物相互作用の評価方法のガイドライン [7] がまとめられており、これらの情報が臨床現場で役立てられている。

このような背景から、薬物相互作用の多い CYP で代謝される医薬品の開発が避けられる傾向にある。一方、CYP で代謝を受けにくい化合物を選択した結果、non-CYP 代謝酵素で代謝される医薬品が増えてきている。しかし、non-CYP 代謝酵素は CYP のように酵素分子種の種差や遺伝子多型などの情報が少なく、分子種同定のための *in vitro* 代謝試験法も確立されていないのが現状である [8, 9]。Non-CYP 代謝酵素に関する情報の少なさは、薬物の動態学的特性の評価の際に non-CYP 代謝酵素の関与を見逃すリスクを高める可能性がある。Non-CYP 代謝酵素が関与した代表的な薬物相互作用として、ソリブジンと 5-フルオロウラシル (5-FU) の併用時に致死的な副作用が発生した事例が知られている。ソリブジンの代謝産物が 5-FU の代謝律速酵素であるジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ (DPD) を不可逆的に阻害したため、5-FU の体内濃度の異常上昇が起これ、多数の死者が発生した [10-12]。これ以外にも、予期しない non-CYP 代謝酵素が関与する毒性が発現したために、臨床試験の段階で開発が中止された事例が報告されている [13, 14]。これらのことから、医薬品の有効性と安全性を確保するために、non-CYP 代謝酵素に関する情報の蓄積が望まれる。

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、胃腸障害の軽減を目的としたプロドラッグである。Nabumetone は生体内で活性代謝物 6-methoxy-2-naphthylacetic acid (6-MNA) に変換されて薬効を発揮する。6-MNA の生体内半減期は約 21 時間と長く、また、NSAIDs の中では副作用が比較的少ないとされ、がん終末期の人に対しても、長期にわたり連用可能な NSAID であるとされている [15-17]。しかし、活性代謝物以外に

も複数の代謝物が存在し、これらの代謝経路や代謝酵素に関する情報には不明な点が多い。

Nabumetone は体内で、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である 6-MNA になる経路、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) になる経路、および 6-methoxy 基が脱メチル化されて 4-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)butan-2-one (M3) になる経路の 3 つで消失することがわかっている (Fig. 1)。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 [18]。このように、nabumetone の代謝には、複数の経路と複数の CYP と non-CYP の代謝酵素が関わっていることが示唆されているが、これらの情報は十分に明らかにされていない。

Nabumetone はプロドラッグなので、薬物動態を把握するために、活性化と不活化に関与する代謝酵素を特定することが必要である。さらに、nabumetone が活性化せずに消失する経路（非活性化）に関する代謝酵素も存在する。

本研究では、nabumetone のこれらの代謝特性を *in vitro* 代謝実験により評価した。これにより得られる情報は、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献することが期待される。

第 1 章では nabumetone から活性代謝物 6-MNA への酸化的代謝について、第 2 章では活性代謝物 6-MNA の不活化代謝について、第 3 章では nabumetone の非活性化代謝、すなわち、炭素鎖中のケトンが 2 級アルコールに還元され MNBO となる経路および 6-methoxy 基が脱メチル化されて M3 になる経路について、種々の酵素源および補酵素を用いて *in vitro* 代謝実験により評価した。

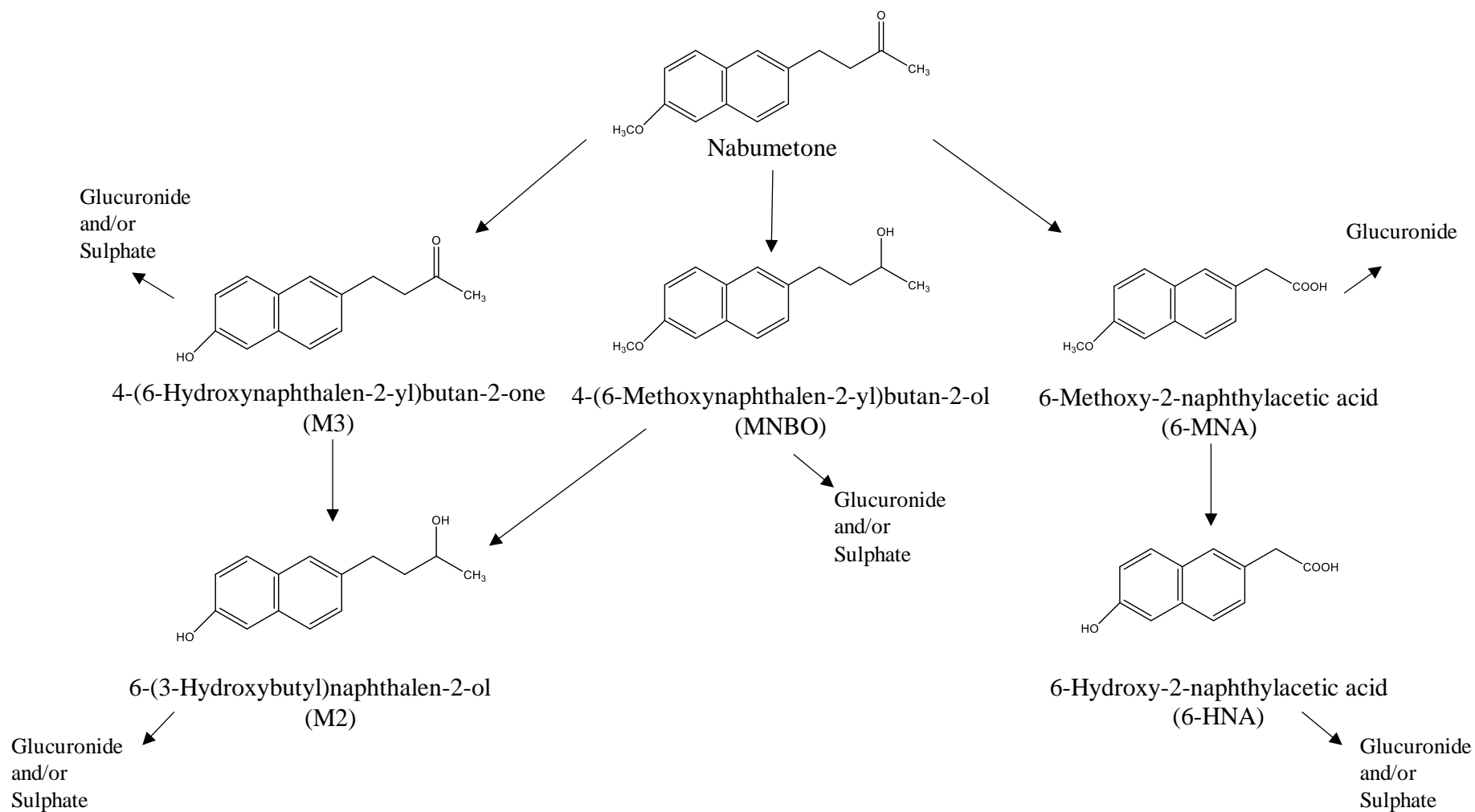


Fig. 1 Known metabolic pathways of nabumetone [18] .

第1章 Nabumetone から活性代謝物 6-methoxy-2-naphthylacetic acid (6-MNA) への酸化代謝に関する検討

第1節 緒言

Nabumetone は、プロドラッグ型の NSAID であり、未変化体のまま吸収された後、体内で活性代謝物である 6-MNA への迅速な生体内変換を受ける。Nabumetone の *in vivo* 代謝は、ラット、マウス、ウサギ、イヌ、アカゲザルおよびヒトで研究されている。ヒトおよび実験動物に ^{14}C -nabumetone を経口投与した後の血漿および尿検体の薄層クロマトグラフィーによる結果では、主要な全身循環代謝物は 6-MNA であり、血漿中および尿中に未変化体はほとんど検出されず、ヒトでは 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 [18]。

Table 1 および Fig. 2 (囲み線内) に、nabumetone から 6-MNA へ代謝に関する今までの代表的な研究報告を示す [19-23]。Turpeinen ら [19] と Lee ら [23] は nabumetone から 6-MNA の代謝には CYP が関与しており、主に CYP1A2 が触媒すると報告している。Varfaj らは、nabumetone が CYP1A2 により 3-ヒドロキシ化を受けて 3-ヒドロキシ体 (3-OH-NAB) となり、さらに CYP1A2 により酸化されて 6-MNA に変換されると報告している [20]。また、Nobilis らも、nabumetone が中間代謝物である 3-ヒドロキシ体を経由して 6-MNA に変換されると報告している。しかし、Nobilis らの結果では、マイクロソーム画分で nabumetone から 3-ヒドロキシ体は生成したが、6-MNA は生成せず、ラット遊離肝細胞中でのみ 6-MNA が生成したことから、3-ヒドロキシ体から 6-MNA への変換にはマイクロソーム画分ではない他の細胞画分の関与の可能性を示唆している [21]。

近年、Fiorentini らはヒトフラビン含有モノオキシゲナーゼ 5 (hFMO5) が、nabumetone からその側鎖のカルボニル基の隣に酸素原子が挿入されたエステル体である 2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)ethyl acetate (6-MNEA) へと変換する Baeyer-Villiger 酸化に関与していることを報告した [22]。Fiorentini らはさらに、6-MNEA が nabumetone から 6-MNA への経路の中間代謝物であると推察している。このように nabumetone から 6-MNA の変換には何らかの中間体を経由している可能性が示唆されているが、代謝経路および代謝酵素の詳細は不明のままである。Nabumetone から 6-MNA への代謝経路および代謝酵素を明らかにすることは、プロドラッグである nabumetone の薬効発現だけでなく、薬物相互作用を考える上で臨床的に非常に重要である。

Table 1 Representative studies of nabumetone metabolism.

Author	Enzymes	Intermediate metabolite	Enzyme source
<i>• Nabumetone ⇒ 6-MNA</i>			
Turpeinen et al. (2009)	CYP1A2 (CYP2B6, 2C19, 2D6, 2E1)		HLM, supersomes of cDNA expressed CYPs
Lee et al. (2010)	CYP1A2, 3A4, 2J2		HLM, supersomes of cDNA expressed CYPs
Nobilis et al. (2013)		3-OH-NAB	HLM, RLM, HLC, RLC, RH
Varfaj et al. (2014)	CYP1A2 (CYP3A4, 2B6)	3-OH-NAB	purified CYPs, supersomes of cDNA expressed CYPs
<i>• Nabumetone ⇒ 6-MNEA</i>			
Fiorentini et al. (2017)	FMO5		purified FMOs, lyophilized <i>E. coli</i> whole cells expressing recombinant FMOs, <i>E. coli</i> membrane fraction obtained after breakage of cells expressing FMOs

HLM : human liver microsomes, RLM : rat liver microsomes, HLC : human liver cytosol, RLC : rat liver cytosol, RH : rat hepatocytes

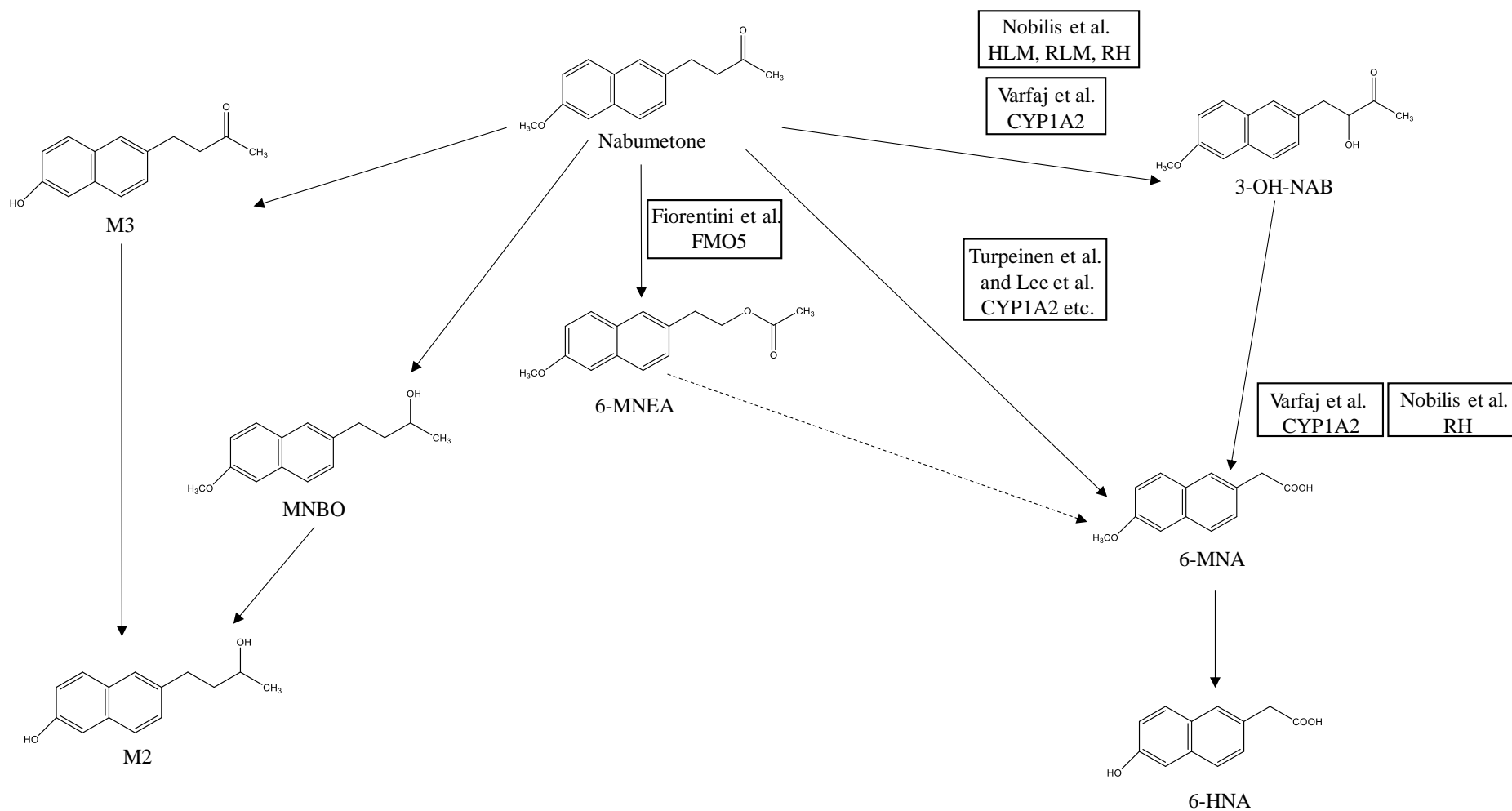


Fig. 2 Reported several metabolic pathways of nabumetone.
 Representative studies of nabumetone metabolism are shown in the square.
 HLM : human liver microsomes, RLM : rat liver microsomes, RH : rat hepatocytes

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, 次の2つの経路について *in vitro* 代謝実験でアプローチした.

- 1) nabumetone から 6-MNEA を介した 6-MNA への経路
- 2) nabumetone から 3-OH-NAB を介した 6-MNA への経路

1) では, はじめにヒト肝ミクロソーム, S9 および凍結ヒト遊離肝細胞を用いて nabumetone から 6-MNA が生成する条件を検証した. 次に, ヒト FMO 発現系ミクロソームを用いて nabumetone から 6-MNEA の生成を確認した. さらに, ヒト FMO 発現系ミクロソームを用いた代謝実験の生成代謝物にヒト肝ミクロソーム, サイトゾルおよび S9 と各々の補酵素を添加して2段階の代謝実験(2段階インキュベーション)を行い, ヒト FMO 発現系ミクロソームを用いた代謝実験の生成代謝物から 6-MNA が生成するかを確認した.

2) では, まず, ヒト CYP 発現系ミクロソームを用いて nabumetone から 3-OH-NAB の生成を確認した. 次に, nabumetone と同様に 3-OH-NAB においても2段階の代謝実験を行い, 3-OH-NAB から 6-MNA が生成するか確認した.

第2節 実験材料と実験方法

1-2-1 試薬および酵素源

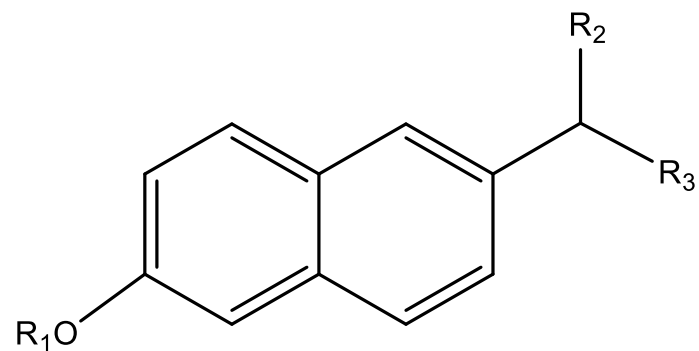
Nabumetone は LKT Laboratories, Inc. (St. Paul, MIN, USA) より購入した。6-MNA は和光純薬工業(大阪)より購入した。3-Hydroxyl-4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)butan-2-one (3-OH-NAB), 6-MNEA, 2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)ethan-1-ol (6-MNE-ol), 2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)acetaldehyde (6-MN-CHO) および 1-(6-methoxynaphthalen-2-yl)butane-2,3-diol (6-MN-diol) は城西国際大学薬学部生物有機化学研究室で合成したものを使用した。6-(3-Hydroxybutyl)naphthalen-2-ol (M2), M3 および MNBO は三和化学研究所から供与されたものを使用した。Naproxen は東京化成工業(東京)より購入した (Fig. 3)。

Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP^+), nicotinamide adenine dinucleotide reduced form (NADH) および nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH) はオリエンタル酵母工業(東京)より購入した。

N-Benzylimidazole (NBI), *bis*(*p*-nitrophenyl) phosphate (BNPP) および methoxyamine hydrochloride は Sigma-Aldrich Co. LLC. (St Louis, MO, USA) より購入した。4-Methylpyrazole (4-MP), menadione (MD), allopurinol (AP), ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EDTA) tetrasodium salt tetrahydrate および 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) は和光純薬工業より購入した。Disulfiram (DF), 4-methoxyphenylacetone (4-MP-one), 4-(*N,N*-dimethylaminosulphonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-H), trifluoroacetic acid および raloxifene は東京化成工業より購入した。Eserine は ChromaDex, Inc. (Irvine, CA, USA), PMSF solution は Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA)より購入した。

150 ドナープールドヒト肝 S9, ミクロソーム, サイトゾル, FMO 発現系ミクロソームおよび FMO コントロールミクロソームは Corning Life Sciences (Tewksbury, MA, USA) より購入した。FMO 発現系ミクロソームはバキュロウイルス感染昆虫細胞に発現させたものを用いた。CYP 発現系ミクロソームは, 大腸菌に発現させたもの (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2J2, CYP3A4 および CYP3A5) を Cypex (Dundee, UK) より購入した。なお, CYP 発現系ミクロソームは NADPH-cytochrome P450 reductase と cytochrome-*b5* を共発現させたものである。ALDH および AO 発現系サイトゾルは, 大腸菌に発現させたものを Cypex より購入した。コントロールサイトゾルも Cypex より購入した。ヒト凍結遊離肝細胞 (HEP187165, HEP187229, HEP702001) は Biopredic International (Rennes, France) より購入した。

その他の試薬は特級または high-performance liquid chromatography (HPLC) 分析用またはそれに相当する試薬を使用した。

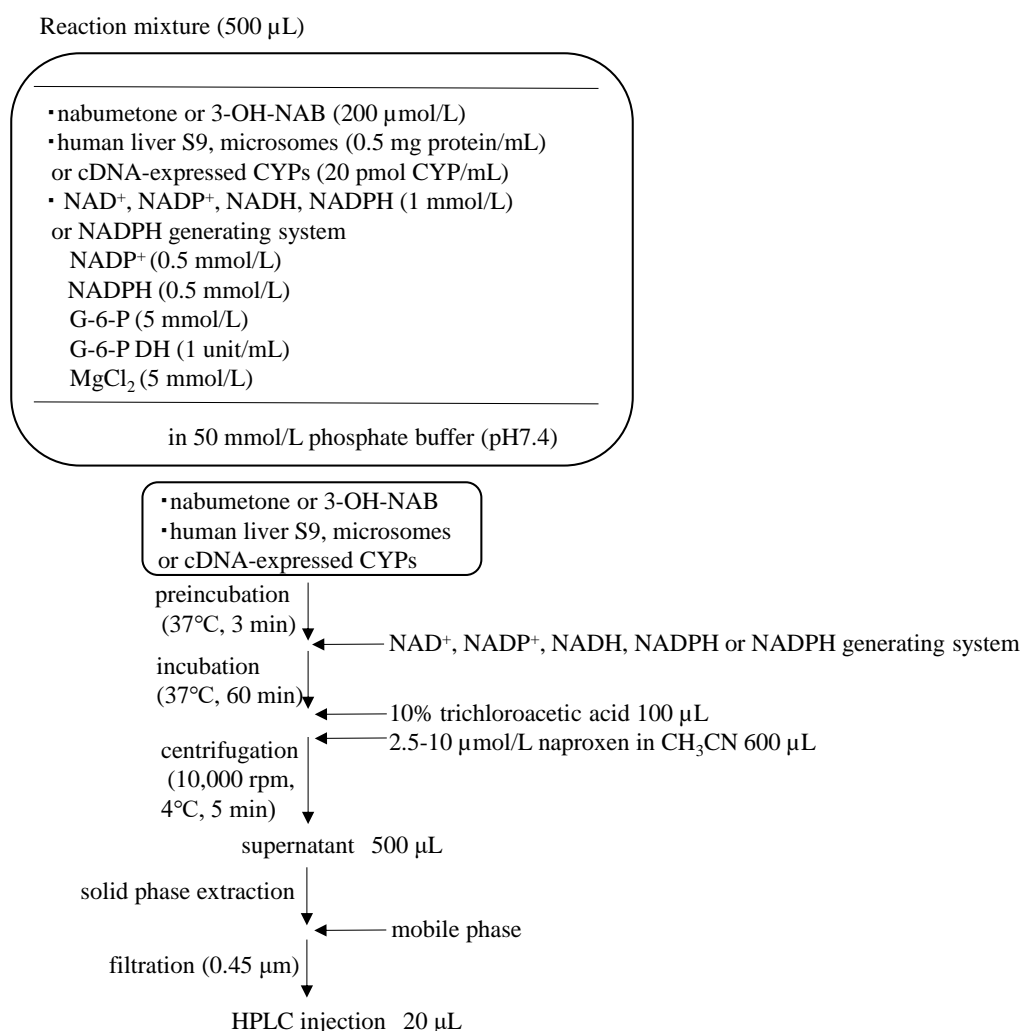


No.	compound name	code	R ₁	R ₂	R ₃	MW
1	6-hydroxyl-2-naphthylacetic acid	6-HNA	H	H	COOH	202
2	6-(3-hydroxybutyl)naphthalen-2-ol	M2	H	H	CH ₂ -CH(OH)-CH ₃	216
3	1-(6-methoxynaphthalen-2-yl)butane-2,3-diol	6-MN-diol	CH ₃	H	CH(OH)-CH(OH)-CH ₃	246
4	4-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)butan-2-one	M3	H	H	CH ₂ -C(=O)-CH ₃	214
5	6-methoxy-2-naphthylacetic acid	6-MNA	CH ₃	H	COOH	216
6	2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)ethan-1-ol	6-MNE-ol	CH ₃	H	CH ₂ -OH	202
7	3-hydroxyl-4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)butan-2-one	3-OH-NAB	CH ₃	H	CH(OH)-C(=O)-CH ₃	244
8	2-(6-methoxy-2-naphthyl)propionic acid	naproxen	CH ₃	CH ₃	COOH	230
9	2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)acetaldehyde	6-MN-CHO	CH ₃	H	CHO	200
10	4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)butan-2-ol	MNBO	CH ₃	H	CH ₂ -CH(OH)-CH ₃	230
11	4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)butan-2-one	nabumetone	CH ₃	H	CH ₂ -C(=O)-CH ₃	228
12	2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)ethyl acetate	6-MNEA	CH ₃	H	CH ₂ -O-C(=O)-CH ₃	244

Fig. 3 Chemical structures of nabumetone, its metabolites and naproxen.

1-2-2 ヒト肝 S9, ミクロソームおよび CYP 発現系ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝実験

ヒト肝 S9 およびミクロソームによる nabumetone および 3-OH-NAB の代謝活性は, Scheme 1 に示す反応条件で測定した. Nabumetone または 3-OH-NAB (200 $\mu\text{mol/L}$), ヒト肝 S9 またはミクロソーム (0.5 mg protein/mL), 各種補酵素 (1 mmol/L ; NAD^+ , NADP^+ , NADH または NADPH) または NADPH 生成系および 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む全量 0.5 mL の反応液で代謝実験を行った. 補酵素を除く上記の反応液を 37°C, 3 分間プレインキュベーションした後, 補酵素を添加して反応を開始した. 37°C, 60 分間インキュベーションした後, 10%トリクロロ酢酸水溶液 100 μL および内部標準物質 naproxen (2.5-10 $\mu\text{mol/L}$) を含むアセトニトリル溶液 600 μL を添加して, 反応を停止した. 反応液は 4°C で 10,000 rpm, 5 分間遠心分離し, 得られた上清を試料とした.



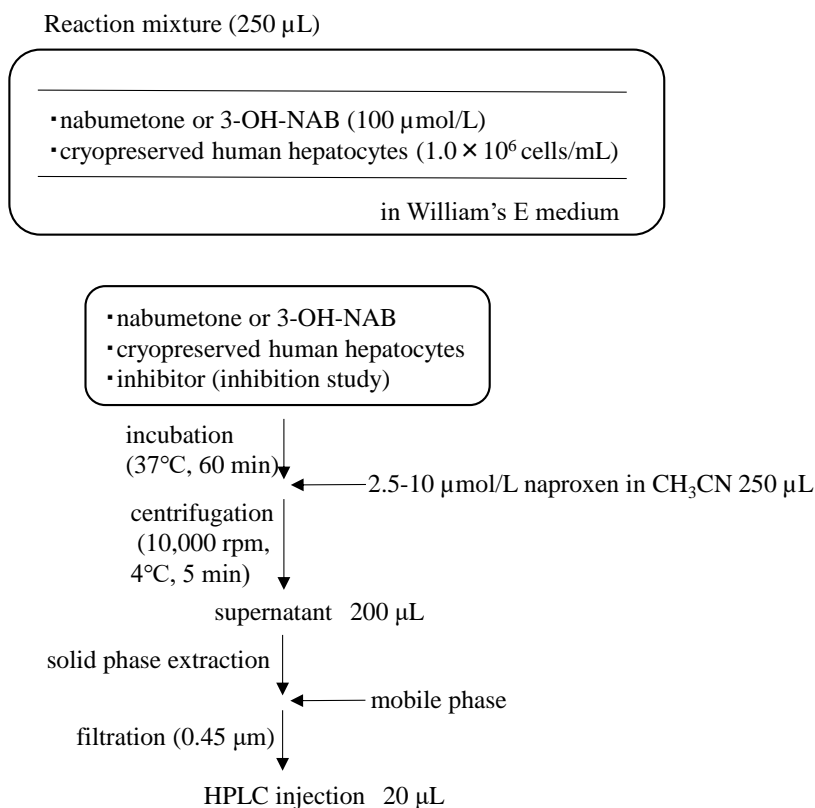
Scheme 1 Procedure of *in vitro* metabolism experiment in human liver S9, microsomes or cDNA-expressed CYPs.

発現系マイクロソームによる代謝試験は、各分子種発現系の濃度を 20 pmol CYP/mL とした。

試料の前処理は、Mikami らの方法 [24] を若干変更して行った。試料は 5%メタノール水溶液でコンディショニングした Bond-Elut CertifyII カートリッジ (Agilent Technologies, Inc.; Santa Clara, CA, USA) に流し、水で洗浄後、ヘキサン-酢酸エチル (1:1) で溶出した。溶出液は窒素気流下で濃縮乾固させ、残渣を HPLC の移動相溶媒に再溶解後、メンブランフィルター (0.45 μm) でろ過し、HPLC で測定した。

1-2-3 凍結ヒト遊離肝細胞を用いた *in vitro* 代謝実験

凍結ヒト遊離肝細胞を 37°C のウォーターバスで速やかに融解し、細胞濃度が 2.0×10^6 cells/mL となるように William's E 培地で懸濁させた。48 ウェルプレートに nabumetone (200 $\mu\text{mol/L}$) 125 μL または 3-OH-NAB (200 $\mu\text{mol/L}$) 125 μL とヒト遊離肝細胞 (2.0×10^6 cells/mL) 125 μL を添加し、37°C, 5%CO₂ で 60 分間インキュベーションした。Naproxen (2.5-10 $\mu\text{mol/L}$) を含むアセトニトリル溶液 250 μL を加えて反応を停止し、遠心分離した後、得られた上清を試料とした。試料は 1-2-2 の方法と同様に前処理を行い、HPLC で測定した。



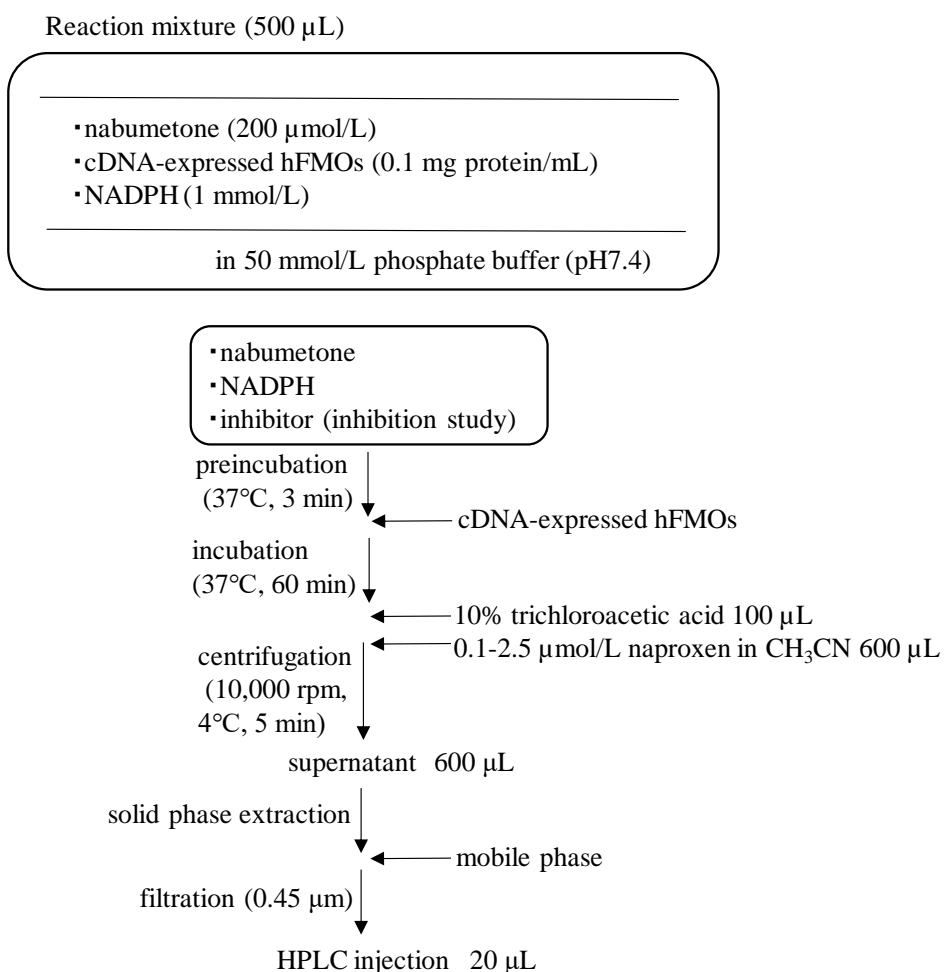
Scheme 2 Procedure of *in vitro* metabolism experiment in cryopreserved human hepatocytes.

阻害実験では、最終濃度が 1 mmol/L となるように CYP の阻害剤 *N*-benzylimidazole (NBI) [25]

または Baeyer-Villiger monooxygenase (BVMO) の基質である 4-MP-one [26, 27] を添加して阻害実験を行った (Scheme 2). 反応液中の有機溶媒濃度は 1% 以下になるように調整した. 阻害剤の影響はそれぞれ阻害剤非添加のものをコントロールとして検討した.

1-2-4 ヒト FMO 発現系ミクロソームを用いた nabumetone の *in vitro* 代謝実験

ヒト FMO 発現系ミクロソームによる nabumetone の代謝活性は, Scheme 3 に示す反応条件で測定した. 反応条件は nabumetone (200 $\mu\text{mol/L}$), ヒト FMO 発現系ミクロソーム (0.1 mg protein/mL), NADPH (1 mmol/L) および 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.5 mL の反応液で測定をした. FMO 発現系ミクロソームを除く上記の反応液は 37°C, 3 分間プレインキュベーションをシジョンした後, 反応は FMO 発現系ミクロソームの添加により開始した.



Scheme 3 Procedure of *in vitro* metabolism of nabumetone in cDNA-expressed hFMOs.

37°C, 60 分間インキュベーションした後, 10%トリクロロ酢酸水溶液 100 μL および内部標準物質である 0.1-2.5 $\mu\text{mol/L}$ naproxen アセトニトリル溶液 600 μL を添加して, 反応を停止した. 反

応液は 4°C で 10,000 rpm, 5 分間遠心分離し, 得られた上清を試料とした. 試料は 1-2-2 の方法と同様に前処理を行い, HPLC で測定した.

阻害実験は, ヒト FMO5 発現系マイクロソームを用いて nabumetone の濃度は 10 $\mu\text{mol/L}$ で行い, 最終濃度が 1 mmol/L となるように BVMO の基質である 4-MP-one を添加して行った (Scheme 3). 反応液中の有機溶媒濃度は 1% 以下になるように調整した. 阻害剤の影響はそれぞれ阻害剤非添加のものをコントロールとして検討した.

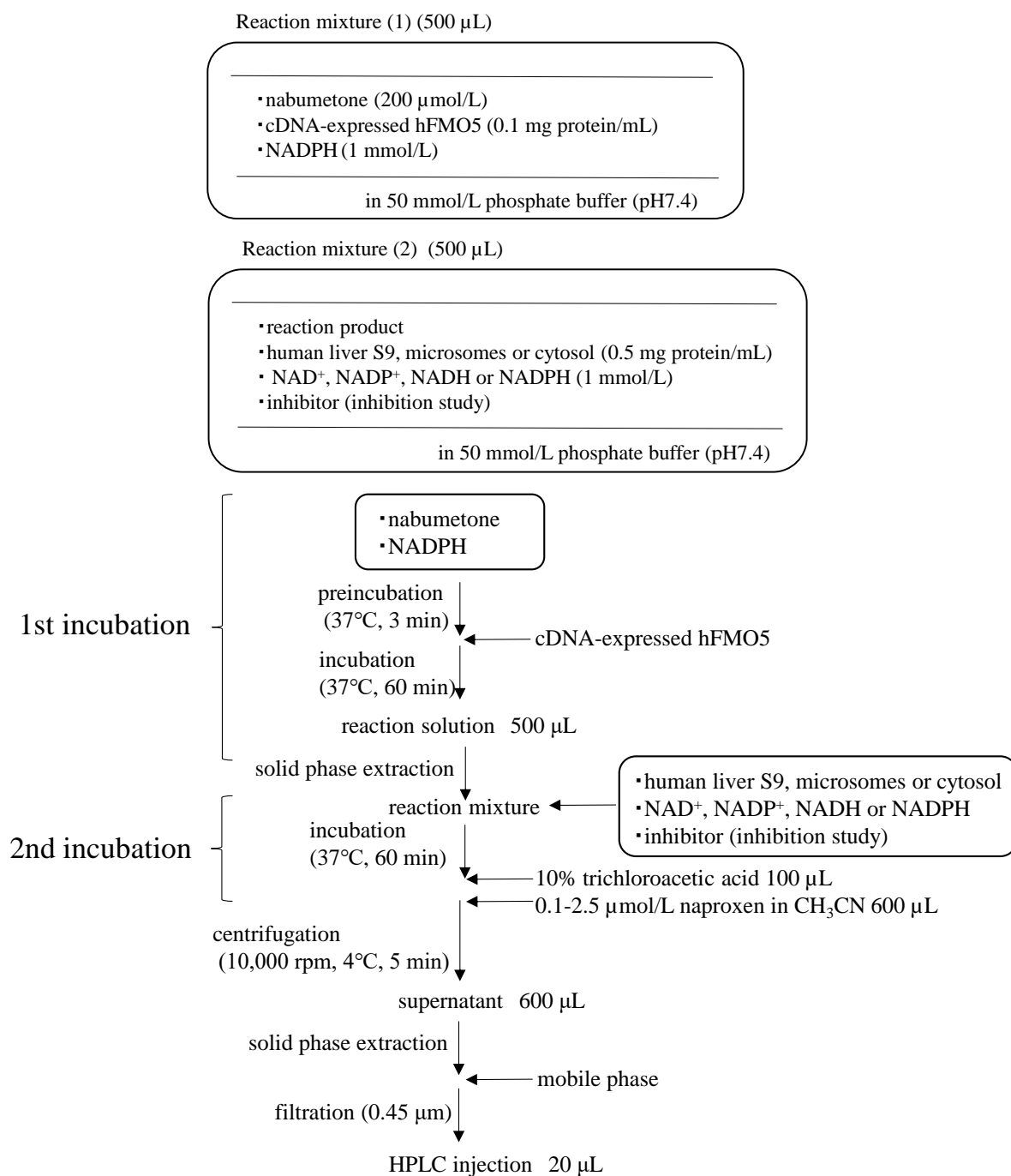
1-2-5 ヒト FMO5 発現系マイクロソームで生成した nabumetone の代謝物を基質として用いた *in vitro* 代謝実験 (2 段階代謝実験)

1-2-4 のヒト FMO5 発現系マイクロソームを用いた *in vitro* 代謝実験の反応液 (0.5 mL) を 60 分間インキュベーション (1st incubation) した後, 酵素源と補酵素を除去するために, 5%メタノール水溶液でコンディショニングした Bond-Elut CertifyII カートリッジに通し, 水で洗浄後, ヘキサン-酢酸エチル (1:1) で溶出した. 溶出液は窒素気流下で濃縮乾固し, 残渣にヒト肝 S9, マイクロソームまたはサイトゾル (0.5 mg protein/mL), 各種補酵素 (1 mmol/L ; NAD⁺, NADP⁺, NADH, NADPH) および 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.5 mL の反応液を加えて反応 (2nd incubation) を開始した. 阻害実験では, 残渣にヒト肝 S9, 補酵素として NAD⁺ および Table 2 の阻害剤 [28-32] を加えた. 反応液中の有機溶媒濃度は 1% 以下になるようにし, 阻害剤の影響はそれぞれ阻害剤非添加のものをコントロールとして検討した.

37°C, 60 分間インキュベーションした後, 10%トリクロロ酢酸水溶液 100 μL および内部標準物質である 0.1-2.5 $\mu\text{mol/L}$ naproxen アセトニトリル溶液 600 μL を添加して, 反応を停止した. 反応液は 4°C で 10,000 rpm, 5 分間遠心分離し, 得られた上清を試料とした. 試料は 1-2-2 の方法と同様に前処理を行い, HPLC で測定した (Scheme 4).

Table 2 Inhibitors used in the inhibition studies.

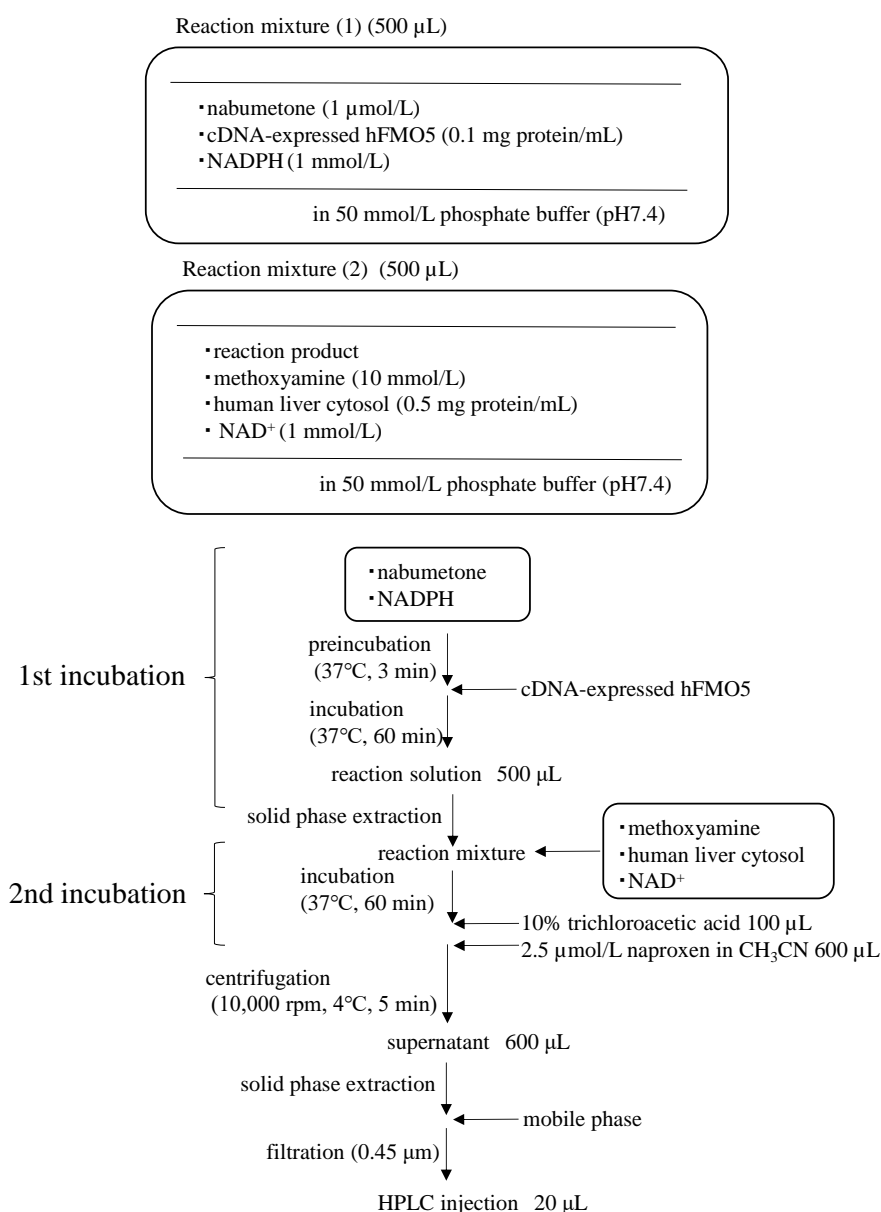
Inhibitor	Concentration (mM)	Enzyme	Enzyme Source	Cofactor
4-Methylpyrazole (4-MP)	0.5	alcohol dehydrogenase (ADH)	cytosol	NAD ⁺
Disulfiram (DF)	1	aldehyde dehydrogenase (ALDH)	microsomes, cytosol	NAD ⁺ , NADP ⁺
Bis(<i>p</i> -nitrophenyl) phosphate (BNPP)	1	carboxylesterase (CES)	microsomes, cytosol	not required
Menadione (MD)	0.1	aldehyde oxidase (AO)	cytosol	not required
Allopurinol (AP)	0.1	xanthine oxidase (XO)	cytosol	not required
<i>N</i> -benzylimidazole (NBI)	1	cytochrome P450 (CYP)	microsomes	NADPH



Scheme 4 Procedure of *in vitro* metabolism of the incubation products of nabumetone by hFMO5 with human liver S9, microsomes or cytosol under various incubation conditions (2 step incubation).

1-2-6 アルデヒド体の検出

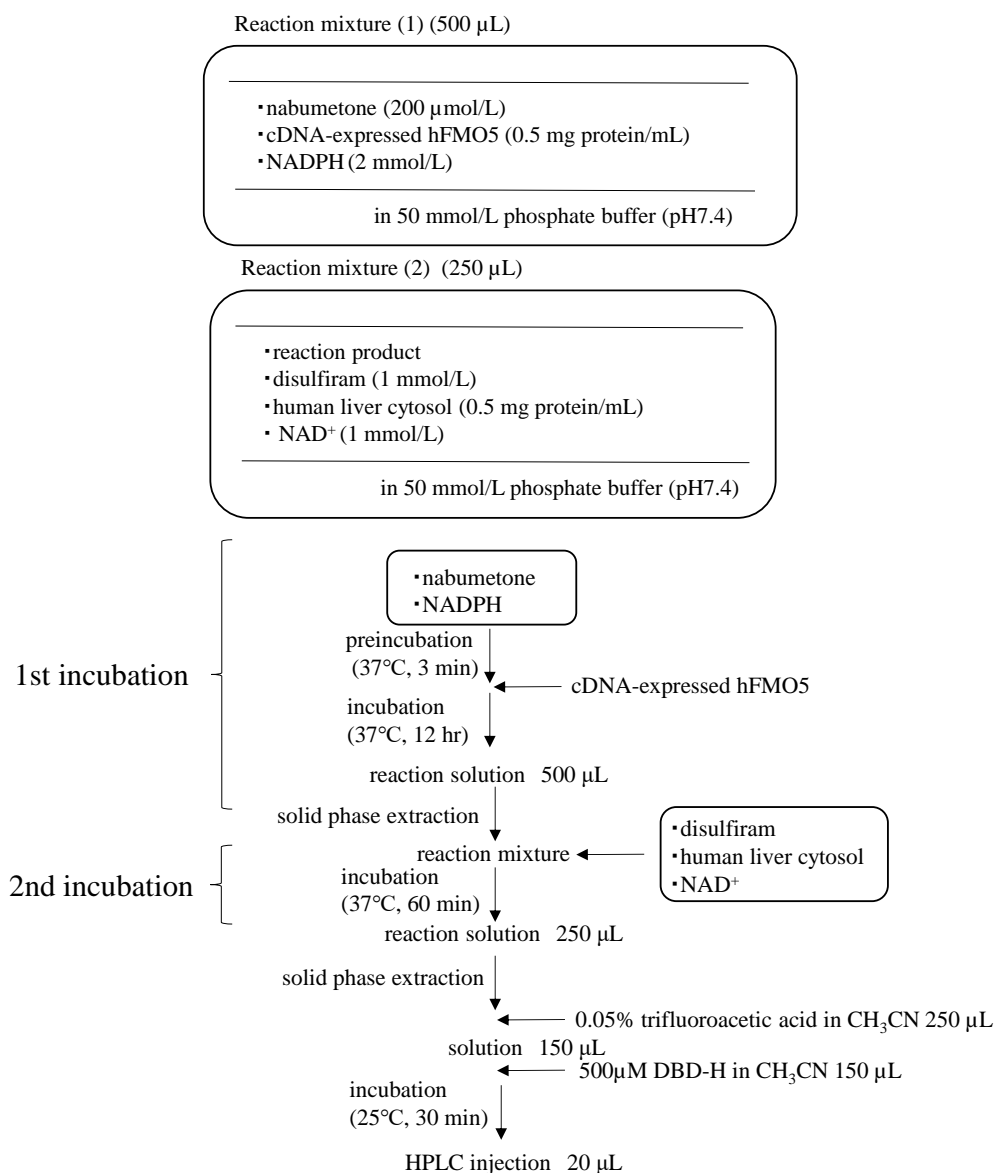
中間代謝物としてアルデヒド体が存在すると考え、2つの方法で1-2-5の代謝実験の反応液中にアルデヒド体が存在するかどうかを確認した。



Scheme 5 Procedure of trapping of aldehyde using methoxyamine.

1-2-6-1 メトキシアミンを用いる方法

ヒト FMO5 発現系マイクロソームを用いて nabumetone (1 $\mu\text{mol/L}$) の代謝実験を行った反応液に、1-2-5 の方法に従い固相抽出を行い、固相抽出後の残渣にヒト肝サイトソーム、補酵素として NAD^+ および最終濃度が 10 mmol/L となるようにアルデヒド体を捕獲する methoxyamine を加えて代謝実験を行った [29, 31, 33]. 反応液中の有機溶媒濃度は 1%以下になるように調整した. Methoxyamine 添加の影響は, methoxyamine 非添加のものと比較することで検討した (Scheme 5).

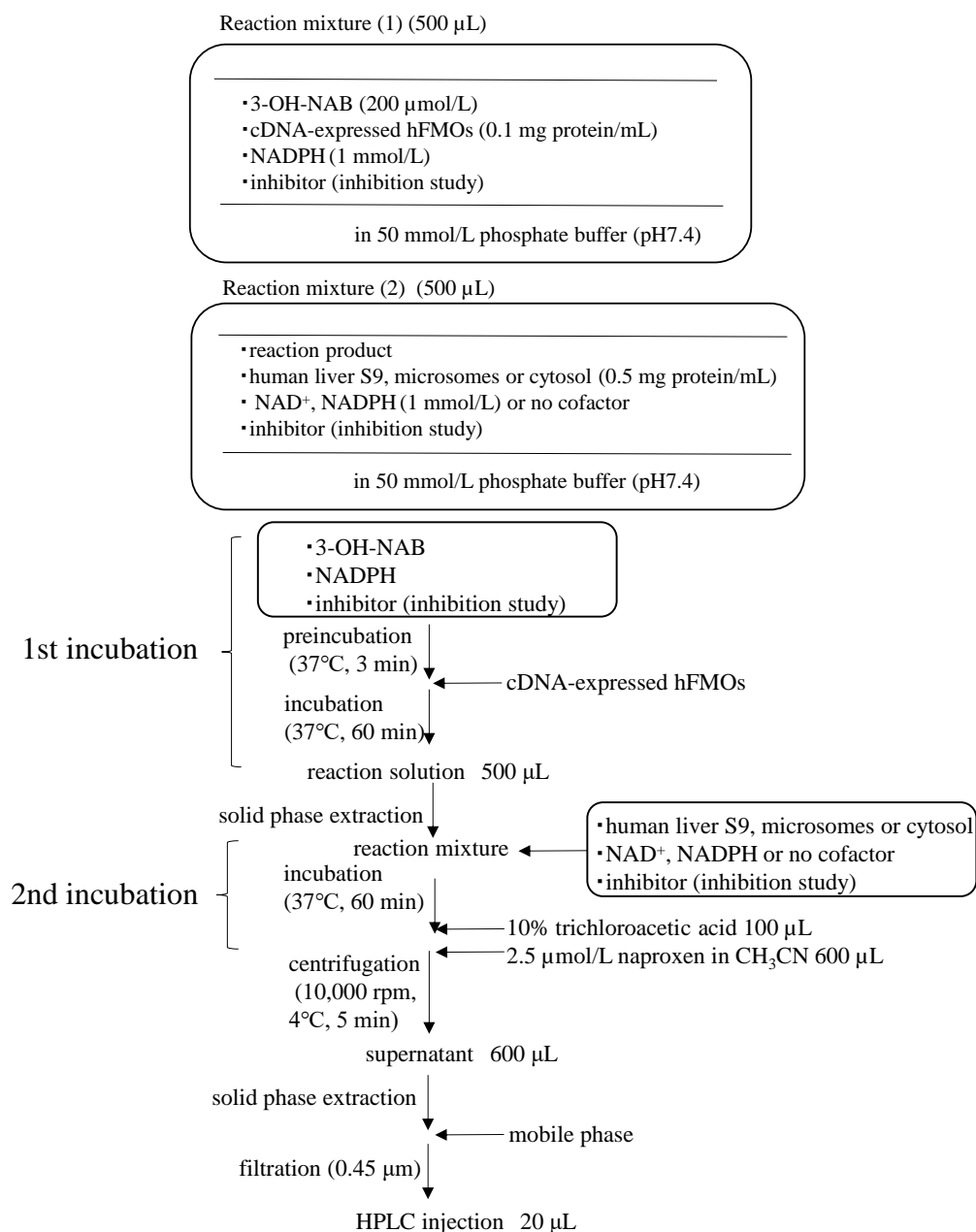


Scheme 6 Procedure of detection of aldehyde by labeling reagent DBD-H.

1-2-6-2 HPLC 用アルデヒドラベル化試薬を用いる方法

HPLC 用アルデヒドラベル化試薬である DBD-H は、アルデヒド体のカルボニル基と反応してアルデヒド誘導体を生成し、HPLC で蛍光検出するものである。ヒト FMO5 発現系マイクロソーム (0.5 mg protein/mL) および NADPH (2 mmol/L) を用いて nabumetone の代謝実験を 12 時間行った反応液に、1-2-5 の方法に従い固相抽出を行い、固相抽出後の残渣にヒト肝サイトゾル、補酵素として NAD⁺を加えて 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で 60 分間反応させた。反応液に ALDH の阻害剤である disulfiram (1 mmol/L) を添加して同様に検討した。反応液 250 μ L は固相抽出を行い、固相抽出後の残渣に 0.05% trifluoroacetic acid を含むアセトニトリル溶液 250 μ L を加えて攪

拌した。攪拌後の溶液 150 μL とラベル化試薬である 500 $\mu\text{mol/L}$ DBD-H アセトニトリル溶液 150 μL を混合し、室温で 30 分間反応させ HPLC 試料とした (Scheme 6) [34]。



Scheme 7 Procedure of *in vitro* metabolism of the incubation products of 3-OH-NAB by hFMOs with human liver S9, microsomes or cytosol under various incubation conditions (2 step incubation).

1-2-7 ヒト FMO 発現系ミクロソームで生成した 3-OH-NAB の代謝物を基質として用いた *in vitro* 代謝実験 (2 段階代謝実験)

ヒト FMO 発現系ミクロソームで生成した 3-OH-NAB の代謝物を基質として用いた *in vitro* 代謝実験 (2 段階代謝実験) は, Scheme 7 に示す反応条件で行った.

3-OH-NAB (200 $\mu\text{mol/L}$), ヒト FMO 発現系ミクロソーム (0.1 mg protein/mL), NADPH (1 mmol/L) および 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.5 mL の反応液を 37°C, 3 分間プレインキュベーションした後, FMO 発現系ミクロソームの添加により反応を開始した. 37°C, 60 分間インキュベーション (1st incubation) した後, 1-2-5 の方法に従い固相抽出を行い, 残渣にヒト肝 S9, ミクロソームまたはサイトゾル (0.5 mg protein/mL), 各種補酵素 (1 mmol/L ; NAD⁺, NADPH または補酵素なし) および 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.5 mL の反応液を加えて反応を開始した. 37°C, 60 分間インキュベーション (2nd incubation) した後, 10%トリクロロ酢酸水溶液 100 μL および内部標準物質である 2.5 $\mu\text{mol/L}$ naproxen アセトニトリル溶液 600 μL を添加して, 反応を停止した. 反応液は 4°C で 10,000 rpm, 5 分間遠心分離し, 得られた上清を試料とした. 試料は 1-2-2 の方法と同様に前処理を行い, HPLC で測定した.

阻害実験は, ヒト FMO5 発現系ミクロソームを用いて 3-OH-NAB の代謝実験を行う際に Table 3 の阻害剤 [35-43] を加えて 60 分間インキュベーションした. 反応液は固相抽出を行い, 残渣にヒト肝 S9, 補酵素として NAD⁺ および Table 3 の阻害剤をもう一度加えて 60 分間インキュベーションした. 反応液中の有機溶媒濃度は 1% 以下になるように調整した. 阻害剤の影響はそれぞれ阻害剤非添加のものをコントロールとして検討した (Scheme 7).

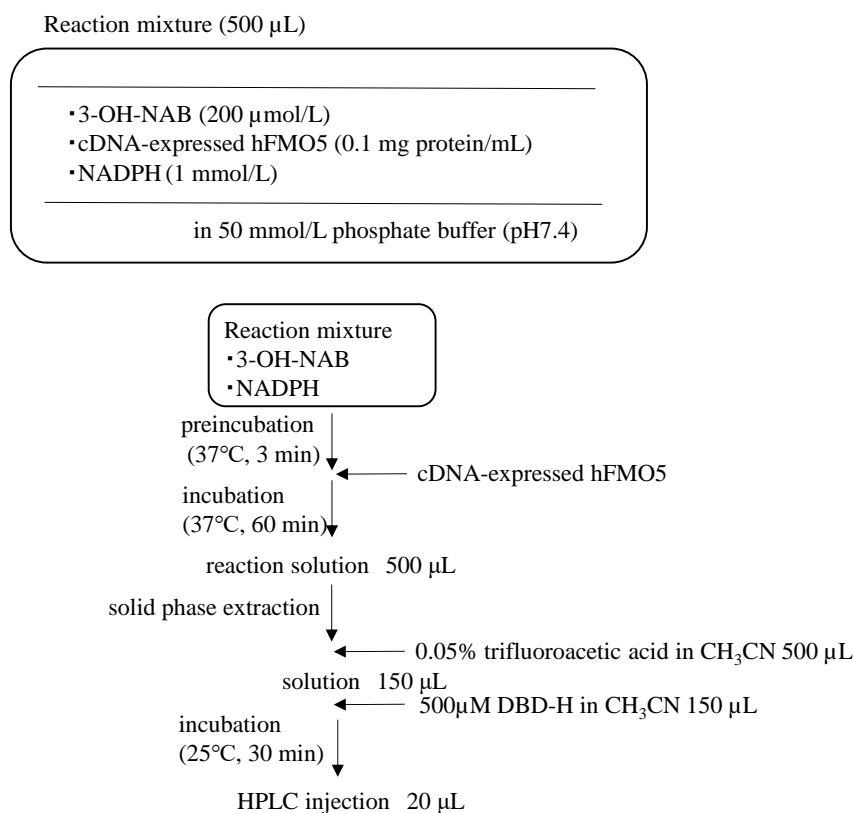
Table 3 Inhibitors used in the inhibition studies.

Inhibitor	Concentration (mM)	Enzyme	Enzyme Source	Cofactor
Disulfiram (DF)	1	aldehyde dehydrogenase (ALDH)	microsomes, cytosol	NAD ⁺ , NADP ⁺
Menadione (MD)	0.1	aldehyde oxidase (AO)	cytosol	not required
Bis(<i>p</i> -nitrophenyl) phosphate (BNPP)	1	carboxylesterase (CES)	microsomes, cytosol	not required
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	1	carboxylesterase (CES)	microsomes, cytosol	not required
Eserine	1	arylacetamide deacetylase (AADAC)	microsomes	not required
EDTA	1	paraoxonase (PON)	microsomes	not required
4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF)	4	serine esterase/protease	microsomes, cytosol	not required

1-2-8 ヒト FMO5 発現系ミクロソームを用いた 3-OH-NAB の *in vitro* 代謝実験の反応液中のアルデヒド体の検出

1-2-6-2 の HPLC 用アルデヒドラベル化試薬を用いる方法で, ヒト FMO5 を用いた 3-OH-NAB の代謝実験の反応液中にアルデヒド体が存在するかどうかを確認した. 1-2-7 のヒト FMO5 発現系ミクロソームを用いた 3-OH-NAB の *in vitro* 代謝実験の反応液 (0.5 mL) を 60 分間インキュベーションした後, 1-2-5 の方法に従い固相抽出を行い, 固相抽出後の残渣に 0.05% trifluoroacetic acid を含むアセトニトリル溶液 500 μL を加えて攪拌した. 攪拌後の溶液 150 μL とラベル化試薬

である 500 $\mu\text{mol/L}$ DBD-H アセトニトリル溶液 150 μL を混合し、室温で 30 分間反応させ HPLC 試料とした (Scheme 8) [34].



Scheme 8 Procedure of detection of aldehyde by labeling reagent DBD-H.

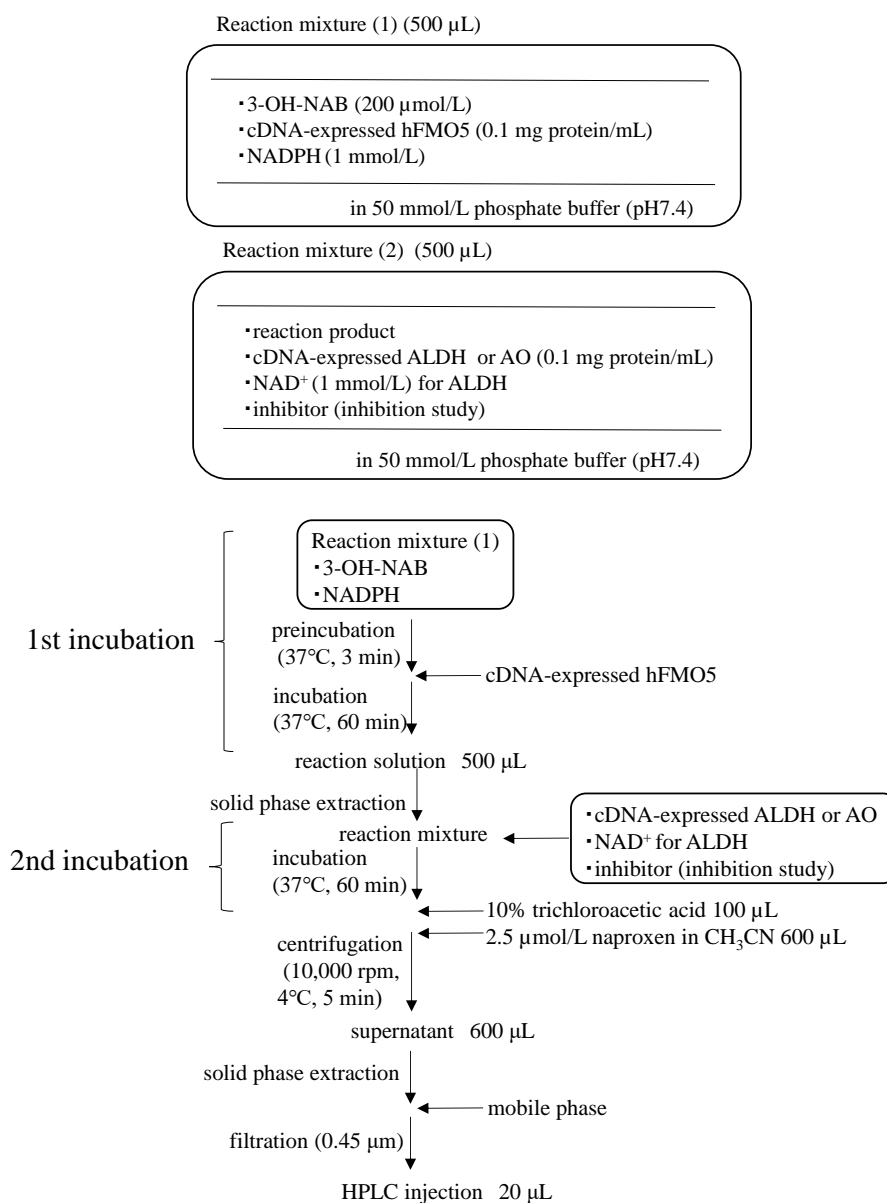
1-2-9 ヒト ALDH および AO 発現系サイトゾルを用いた *in vitro* 代謝実験

ヒト FMO5 発現系ミクロソームを用いた 3-OH-NAB の *in vitro* 代謝実験の反応液 (0.5 mL) を 60 分間インキュベーションした後、1-2-5 の方法に従い固相抽出を行い、固相抽出後の残渣にヒト ALDH または AO 発現系サイトゾル (0.1 mg protein/mL) および 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.5 mL の反応液を加えて反応を開始した。ヒト ALDH 発現系サイトゾルを用いた代謝実験では補酵素である NAD^+ (1 mmol/L) も加えた。

また、阻害実験では、阻害剤としてヒト ALDH 発現系サイトゾルを用いた実験では disulfiram (1 mmol/L)、ヒト AO 発現系サイトゾルを用いた実験では menadione (100 $\mu\text{mol/L}$) または raloxifene (10 $\mu\text{mol/L}$) [30, 32] を反応液に添加した。反応液中の有機溶媒濃度は 1%以下になるようにし、阻害剤の影響はそれぞれ阻害剤非添加のものと比較した。

37°C, 60 分間インキュベーションした後、10%トリクロロ酢酸水溶液 100 μL および内部標準物質である 2.5 $\mu\text{mol/L}$ naproxen アセトニトリル溶液 600 μL を添加して、反応を停止した。反応液は 4°C で 10,000 rpm, 5 分間遠心分離し、得られた上清を試料とした。試料は 1-2-2 の方法と同様

に前処理を行い，HPLC で測定した．コントロールとして，ALDH および AO を含まないコントロールサイトゾルを用いて同様に代謝実験を行った (Scheme 9)．



Scheme 9 Procedure of *in vitro* metabolism of the incubation products of 3-OH-NAB by hFMO5 with cDNA-expressed ALDH or AO.

1-2-10 HPLC の定量条件

3-OH-NAB, 6-MNA, 6-MNEA および 6-MNE-ol は, Kobylínska らの方法 (蛍光 HPLC 法) [44] を若干変更して定量した. HPLC 装置 (島津製作所, 京都) はポンプとして LC-10ADvp, カラムオープンとして CTO-10ACvp, 蛍光検出器として RT-10AxL を用いた. カラムは YMC-Pack ODS-

A (5 μm , 12 nm, 150 \times 4.6 mmI.D., ワイエムシィ, 京都) を用いた. 移動相は 1-2-2 から 1-2-6-1 では 20 mmol/L リン酸水素二カリウム水溶液 (リン酸で pH 3.0 に調整) : アセトニトリル = 3 : 2 , 1-2-7 および 1-2-9 では 20 mmol/L リン酸水素二カリウム水溶液 (リン酸で pH 3.0 に調整) : アセトニトリル = 79 : 21 または 20 mmol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) : アセトニトリル = 3 : 1 で測定した. カラム温度は 30 $^{\circ}\text{C}$, 流速は 1.0 mL/min, 励起波長 280 nm, 蛍光波長 350 nm に設定した.

1-2-6-2 および 1-2-8 の HPLC 用アルデヒドラベル化試薬を用いたアルデヒド体の検出では, HPLC 装置およびカラムは上記と同様のものを用いた. 移動相はアセトニトリル : 0.05% trifluoroacetic acid 水溶液 = 7 : 3 で測定した. カラム温度は 25 $^{\circ}\text{C}$, 流速は 1.0 mL/min, 励起波長 450 nm, 蛍光波長 565 nm に設定した [34].

1-2-11 GC/MS の分析条件

GC/MS を用いて 1-2-4 の *in vitro* 代謝実験で生成した代謝物 (6-MNEA および 6-MNE-ol) の分析を行った. GC/MS 装置はガスクロマトグラフ質量分析計 GCMS-QP2020 (島津製作所) を用いた. 分析カラムは SH Rxi-5Sil MS (30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 250 μm , 島津製作所) を用いた. オープン温度は, 100 $^{\circ}\text{C}$ (ホールド 1 分) から 200 $^{\circ}\text{C}$ まで 8 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で昇温し, さらに 300 $^{\circ}\text{C}$ まで 20 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で昇温し, 12 分間保持した. キャリアガスは定圧モード (112.2 kPa) でヘリウムを使用した. 注入口温度は 250 $^{\circ}\text{C}$ に設定し, 注入モードはスプリットレスとした. インターフェース温度は 250 $^{\circ}\text{C}$ に設定した. イオン化は 70 eV で電子イオン化とし, イオン源温度は 200 $^{\circ}\text{C}$ に設定した. データはスキャンモードで取得し, スキャン範囲は 35~500 m/z とした.

1-2-12 統計解析

阻害実験におけるコントロール (阻害剤非添加) との比較は, 統計ソフト R (version 3.5.1) を用いて対応のない *t* 検定またはダネットの多重比較により評価した. いずれの場合も, 有意水準は $p < 0.01$ とした.

第3節 結果・考察

1-3-1 Nabumetone から 2-(6-methoxy naphthalen-2-yl)ethyl acetate (6-MNEA) を介した 6-MNA への変換に関する検討

1-3-1-1 ヒト肝ミクロソーム, S9 および凍結ヒト遊離肝細胞を用いた nabumetone の *in vitro* 代謝実験

ヒト肝ミクロソーム, S9 および凍結ヒト遊離肝細胞を用いた *in vitro* 代謝実験により, nabumetone から 6-MNA の生成を検討した. ミクロソーム画分に存在する酸化酵素の CYP および FMO は補酵素として NADPH を要求するため, ヒト肝ミクロソームを用いた実験では NADPH を添加した. また, ヒト肝 S9 を用いた実験では, 4 種類の補酵素 (NAD⁺, NADP⁺, NADH, NADPH) を添加した.

各種酵素源と補酵素を用いた nabumetone の代謝実験の結果を Table 4 に, ヒト肝 S9 (補酵素: NADPH) および凍結ヒト遊離肝細胞を用いた nabumetone の *in vitro* 代謝実験の HPLC クロマトグラムを Fig. 4 に示す.

凍結ヒト遊離肝細胞では 6-MNA の生成が観察された (付録 1 参照, p. 115) が, ヒト肝 S9 とミクロソームでは 6-MNA は観察されなかった. また, 凍結ヒト遊離肝細胞では, nabumetone から 6-MNA だけでなく, nabumetone のアルコール体 6-MNE-ol の生成が観察された. 一方, nabumetone の還元代謝物である MNBO, nabumetone の O-脱メチル化体である M3, MNBO および M3 がさらに代謝された M2 は, S9 および凍結ヒト遊離肝細胞の両方で観察された.

S9 画分には薬物代謝に関わるほとんどの酵素が含まれているが, 補酵素は含まれていないため, 代謝実験時に添加する必要がある. S9 では 6-MNA の生成は観られなかったが, 遊離肝細胞では生成がみられた. このことから, nabumetone から 6-MNA の生成には補酵素が異なる複数の酵素が関与しており, 複数の中間代謝物を經由している可能性が示唆された.

Table 4 Formation of 6-MNA in incubations of nabumetone with human microsomes, S9 and cryopreserved hepatocytes under various incubation conditions.

Enzyme source and coenzyme	6-MNA formation rate
Microsomes + NADPH	n.d.
S9 + NADPH	n.d.
S9 + NADH	n.d.
S9 + NADP ⁺	n.d.
S9 + NAD ⁺	n.d.
Hepatocytes	35.4 (pmol/min/10 ⁶ cells)

Data represent the average of duplicate experiments.
n.d., Not detected (Below the detection limit)

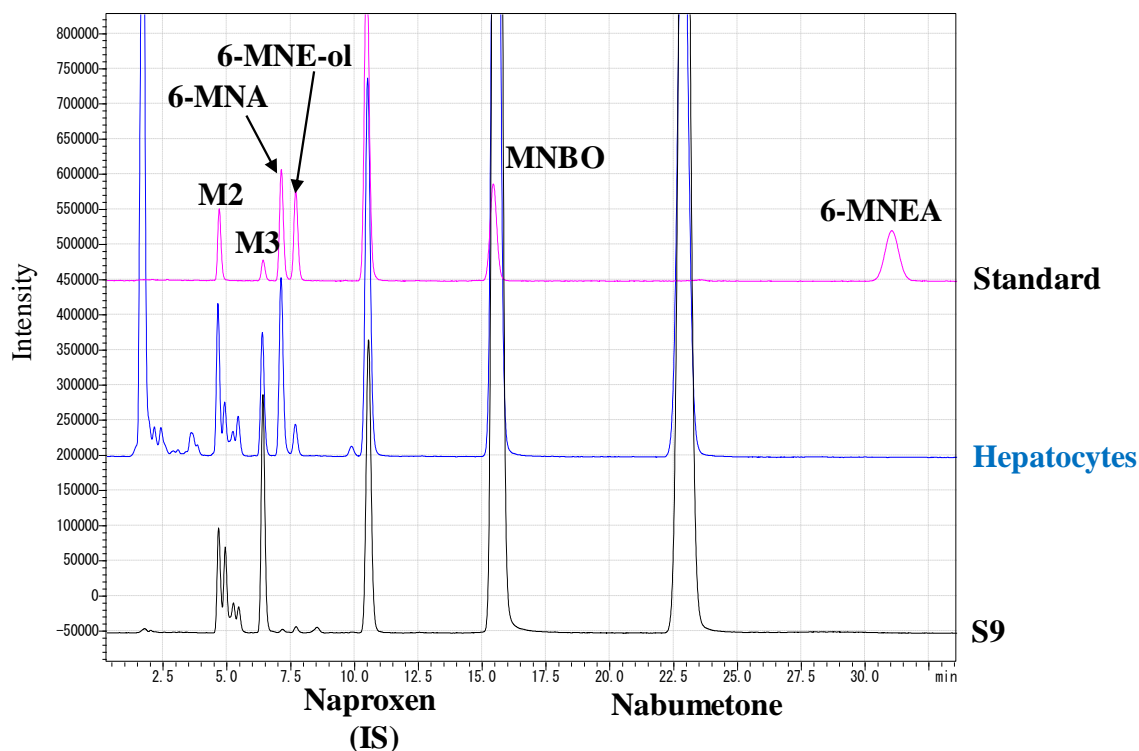


Fig. 4 HPLC chromatograms of the standard and extracts from human liver S9 fractions and cryopreserved hepatocytes incubated with nabumetone (200 and 100 μ M, respectively). The concentration of each standard was 1 μ M.

Turpeinen らは, nabumetone から 6-MNA への生成に CYP が関与していると報告している [19]. そこで, CYP 阻害剤である NBI を用いて凍結ヒト遊離肝細胞における nabumetone から 6-MNA の生成に対する阻害剤の影響を評価した (Fig. 5). NBI 添加により, 6-MNA の生成が阻害されなかったことから, nabumetone から 6-MNA の変換には, CYP 以外の酵素が関与している可能性が示唆された.

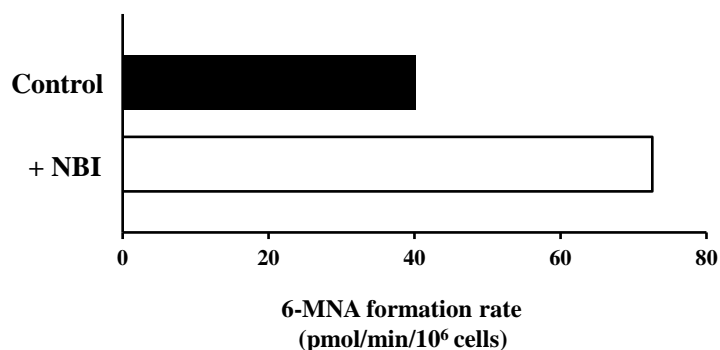


Fig. 5 Effect of NBI on the 6-MNA formation from nabumetone in human cryopreserved hepatocytes. Each bar represents the average of duplicate experiments.

1-3-1-2 ヒト FMO 発現系マイクロソームを用いた nabumetone の *in vitro* 代謝実験

Fiorentini らは、ヒトフラビン含有モノオキシゲナーゼ 5 (hFMO5) が nabumetone から nabumetone のカルボニル基の隣に酸素原子が挿入された nabumetone のエステル体 2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)ethyl acetate (6-MNEA) へ変換する Baeyer-Villiger 酸化に関与していること報告している [22]. Fiorentini らはさらに、6-MNEA が nabumetone から 6-MNA への中間代謝物であると推測している.

そこで、我々も同様にヒト FMO 発現系マイクロソームを用いた nabumetone の *in vitro* 代謝実験を行い、nabumetone から 6-MNEA の生成を検証した. 代謝実験反応液の HPLC クロマトグラムを Fig. 6 に示す. ヒト FMO5 発現系マイクロソームにより、nabumetone のエステル体である 6-MNEA が観察されたが、FMO1 および FMO3 では検出されなかったことから、nabumetone はヒト FMO5 により特異的に Baeyer-Villiger 酸化を受け、6-MNEA を生成することが示唆された. さらに、ヒト FMO5 発現系マイクロソームを用いた代謝実験では、nabumetone のエステル体 6-MNEA だけでなく、6-MNEA が加水分解されて生成するアルコール体の 6-MNE-ol が検出された. なお、生成した代謝物は GC/MS で測定し、合成した標品とピークの保持時間およびマススペクトルパターンが一致することを確認した. Fig. 19 に GC/MS のクロマトグラム示す (節末 p. 38).

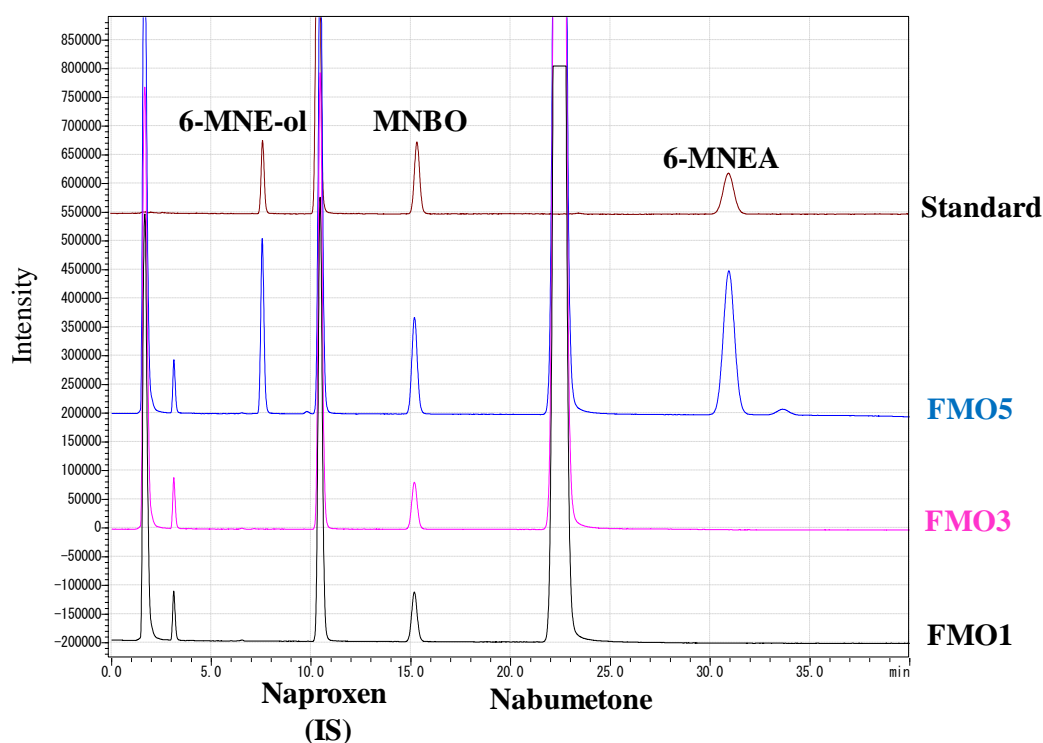


Fig. 6 HPLC chromatograms of the standard and extracts from cDNA-expressed hFMOs incubated with 200 μ M nabumetone.

The concentration of each standard was 1 μ M.

FMO5 を用いた代謝実験により nabumetone からアルコール体 6-MNE-ol が生成したことから、6-MNE-ol の生成に FMO5 が寄与しているかを検討するため、6-MNEA を基質として FMO5 を含まないコントロールマイクロソームで *in vitro* 代謝実験を行ったところ、6-MNE-ol の生成が確認された。一方、6-MNEA を緩衝液中でインキュベーションしたところ、6-MNE-ol は検出されなかった（データは示さない）。緩衝液中でのインキュベーションの結果から、非酵素的に 6-MNE-ol が生成しないことが確認できたので、コントロールマイクロソームでの 6-MNE-ol の生成は、コントロールマイクロソームに残存するエステラーゼ活性によるものと推察した。

4-Methoxyphenylacetone (4-MP-one) は Baeyer-Villiger monooxygenase (BVMO) の基質であることが知られている。そこで、4-MP-one を加えて FMO5 による nabumetone の代謝実験を行い、競合的な阻害が起きるか検討した。4-MP-one の添加により、6-MNEA の生成がコントロールの 31.6%、6-MNE-ol の生成がコントロールの 14.1%まで低下した (Fig. 7A)。

同様に 4-MP-one を加えて凍結ヒト遊離肝細胞で nabumetone の代謝実験を行ったところ、6-MNA の生成がコントロールの 24.0%、6-MNE-ol の生成がコントロールの 31.5%に低下した (Fig. 7B)。

BVMO 基質である 4-MP-one によって FMO5 による 6-MNEA の生成が阻害されたことから、ヒト FMO5 が nabumetone から 6-MNEA への Baeyer-Villiger 酸化を触媒することが確認できた。また、ヒト遊離肝細胞による 6-MNA の生成が 4-MP-one により阻害されたことから、nabumetone から 6-MNA への変換に Baeyer-Villiger 酸化が関与していることが示唆された。

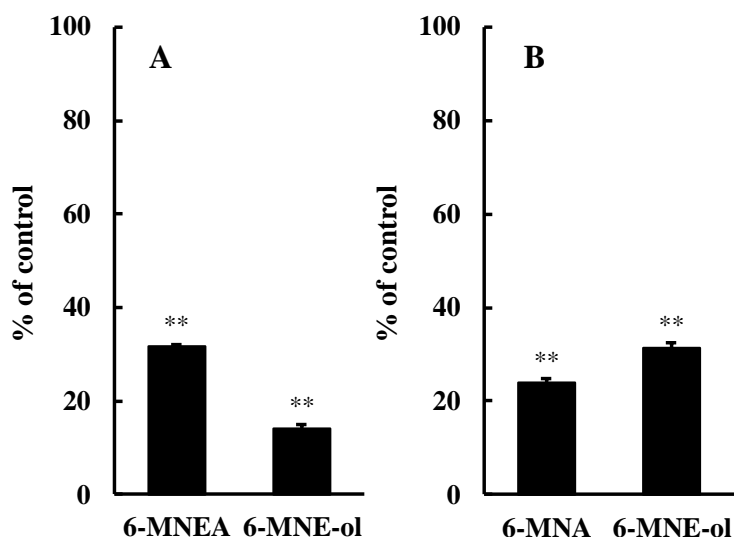


Fig. 7 Effect of 4-MP-one on the 6-MNEA, 6-MNE-ol and 6-MNA formation from nabumetone with cDNA-expressed hFMO5 (A) or cryopreserved hepatocytes (B).

Each bar represents the mean \pm S.D. (n=3). ** $p < 0.001$, compared with no treatment of 4-MP-one.

1-3-1-3 Nabumetone のヒト FMO 発現系マイクロソーム *in vitro* 代謝実験の反応液を基質溶液としたヒト肝マイクロソーム, サイトゾルおよび S9 を用いた *in vitro* 代謝実験 (2 段階代謝実験)

これまでの検討から, nabumetone は Baeyer-Villiger 酸化を受けた後に 6-MNA に変換されることが示唆された. そこで, ヒト FMO1, FMO3 または 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, 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, 1st incubation で FMO5 発現系マイクロソームを用いた反応液でのみ 6-MNA の生成が確認された (データは示さない. LC/MS/MS で分析した結果を付録 1 に示す (p. 115)). このことから, 6-MNEA および 6-MNE-ol は nabumetone から 6-MNA の変換過程における中間代謝物であるという仮定が支持された. また, 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.

FMO5 発現系マイクロソームの反応液にヒト肝マイクロソームまたはサイトゾルに各種補酵素を添加した代謝実験 (2nd incubation) では, マイクロソーム, サイトゾルともに補酵素として NAD⁺および NADP⁺を添加したときに 6-MNA の生成が観察され, サイトゾル中で NAD⁺を添加したときに最も 6-MNA が生成した. 一方, NADPH および NADH 存在下では, 6-MNA はほとんど生成しなかった. これらの結果から 6-MNA の生成には, NAD⁺または NADP⁺要求性の酵素の関与が示唆された (Fig. 8).

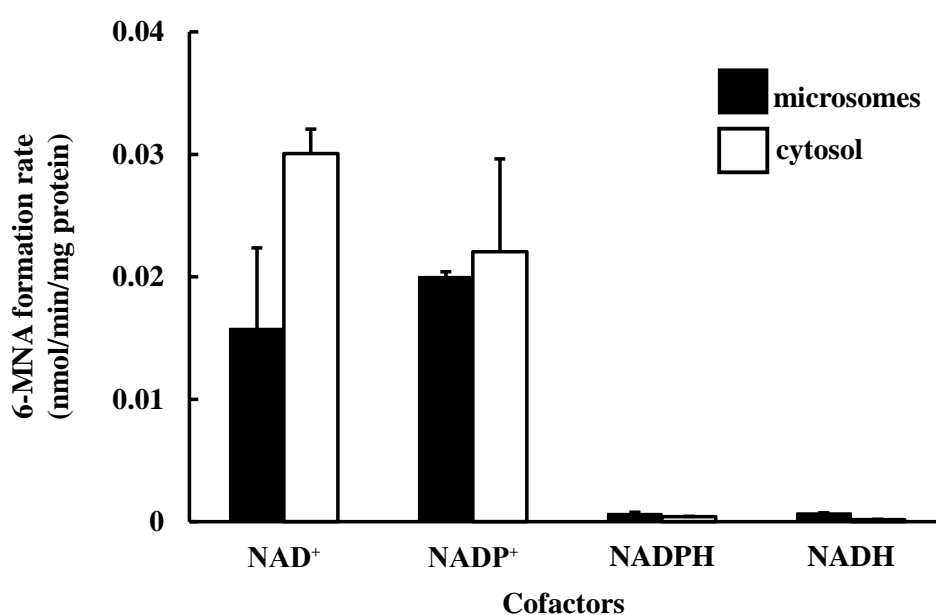


Fig. 8 Formation of 6-MNA after 60 min incubations of the incubation products of nabumetone by hFMO5 with human liver microsomes or cytosol under various incubation conditions. Each bar represents the mean \pm S.D. (n=3).

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に, ヒト肝 S9, 補酵素 NAD⁺および Table 2 (p. 13 再掲) の阻害剤を加えて 2nd incubation にお

ける阻害実験を行った。結果を Fig. 9 に示す。ADH の阻害剤 4-MP, ALDH の阻害剤 DF および CES の阻害剤 BNPP を添加したときに, 6-MNA の生成がそれぞれコントロールの 34.4, 32.6, および 76.4%まで低下した。一方, AO の阻害剤 MD, XO の阻害剤 AP および CYP の阻害剤 NBI ではほとんど阻害されなかった。以上のことから, nabumetone からエステル体を介した 6-MNA の生成には, ADH, ALDH および CES の関与が示唆された。

Table 2 Inhibitors used in the inhibition studies. (p. 13 再掲)

Inhibitor	Concentration (mM)	Enzyme	Enzyme Source	Cofactor
4-Methylpyrazole (4-MP)	0.5	alcohol dehydrogenase (ADH)	cytosol	NAD ⁺
Disulfiram (DF)	1	aldehyde dehydrogenase (ALDH)	microsomes, cytosol	NAD ⁺ , NADP ⁺
Bis(<i>p</i> -nitrophenyl) phosphate (BNPP)	1	carboxylesterase (CES)	microsomes, cytosol	not required
Menadione (MD)	0.1	aldehyde oxidase (AO)	cytosol	not required
Allopurinol (AP)	0.1	xanthine oxidase (XO)	cytosol	not required
<i>N</i> -benzylimidazole (NBI)	1	cytochrome P450 (CYP)	microsomes	NADPH

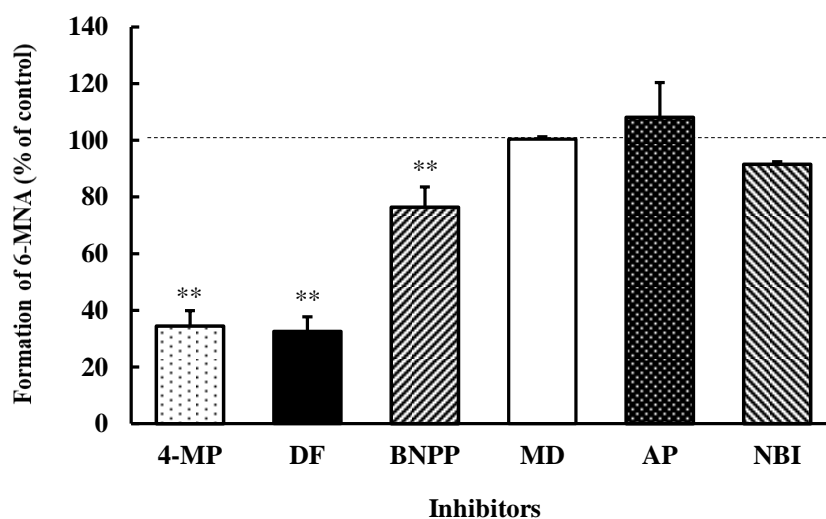


Fig. 9 Inhibition studies of formation of 6-MNA from the incubation products of nabumetone by hFMO5 with human liver S9.

Each bar represents the mean \pm S.D. (n=3-4). ** $p < 0.001$, compared with no treatment of each inhibitor.

1-3-1-4 Nabumetone のヒト FMO5 発現系ミクロソーム *in vitro* 代謝実験の反応液を基質溶液としたヒト肝サイトゾルでの *in vitro* 代謝実験における反応中間体 6-MN-CHO の確認

前項 1-3-1-3 で nabumetone のヒト FMO5 代謝とヒト肝 S9 代謝の 2 段階代謝実験では, 反応液

を HPLC 分析すると、エステル体 (6-MNEA), アルコール体 (6-MNE-ol) および 6-MNA は検出されたが, アルデヒド体 (6-MN-CHO) は検出できなかった. 一般にアルデヒド体は反応性が高く, 不安定であるため HPLC で直接検出するのが難しい. そこで, 6-MN-CHO が nabumetone から 6-MNA の反応中間体としてであるかを, 以下に示す 2 つの方法 (1-3-1-4-1 および 2) で検討した.

1-3-1-4-1 メトキシアミンを用いた方法

1-3-1-3 の nabumetone のヒト FMO5 代謝反応液に, ヒト肝サイトゾルと NAD⁺さらにアルデヒド体を捕獲する methoxyamine を添加して代謝実験 (2nd incubation) を行った. Methoxyamine は nabumetone とも反応するため, nabumetone の適用濃度をできるだけ低くした. Methoxyamine 非存在下に比べて存在下では, 6-MNA の生成が 19.8%低下したことから, 中間体としてアルデヒド体を経由することが示唆された (Fig. 10).

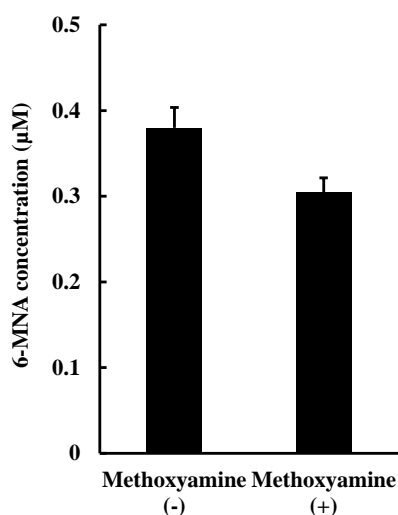


Fig. 10 Formation of 6-MNA from the incubation products of nabumetone by hFMO5 with human liver cytosol in the presence or absence of methoxyamine.

Each bar represents the mean \pm S.D. (n=3).

1-3-1-4-2 HPLC 用アルデヒドラベル化試薬を用いた方法

Nabumetone のヒト FMO5 代謝反応液に, ヒト肝サイトゾルと NAD⁺さらに ALDH の阻害剤 DF を添加して代謝実験を行い, 得られた反応液に DBD-H を加えて HPLC 分析を行った. DBD-H はカルボニル基と室温で速やかに反応してヒドラゾンを形成することで, アルデヒド体を検出する HPLC 用アルデヒドラベル化試薬である. HPLC クロマトグラムを Fig. 11 に示す. クロマトグラム上にアルデヒド体 (6-MN-CHO) と DBD-H の複合体のピークが観察され, アルデヒド体の生成が示唆された (Fig. 11, A). なお, ALDH の阻害剤の DF を添加しない場合, このピークは検出

されなかった (データは示さない). アルコール体 (6-MNE-ol) からアルデヒド体 (6-MN-CHO) の変換速度と比較して, アルデヒド体 (6-MN-CHO) から 6-MNA の変換速度は大きい, アルデヒド体 (6-MN-CHO) は不安定であるが, ALDH 阻害剤の DF と HPLC 用アルデヒドラベル化試薬 DBD-H を用いることでアルデヒド体を検出することができた.

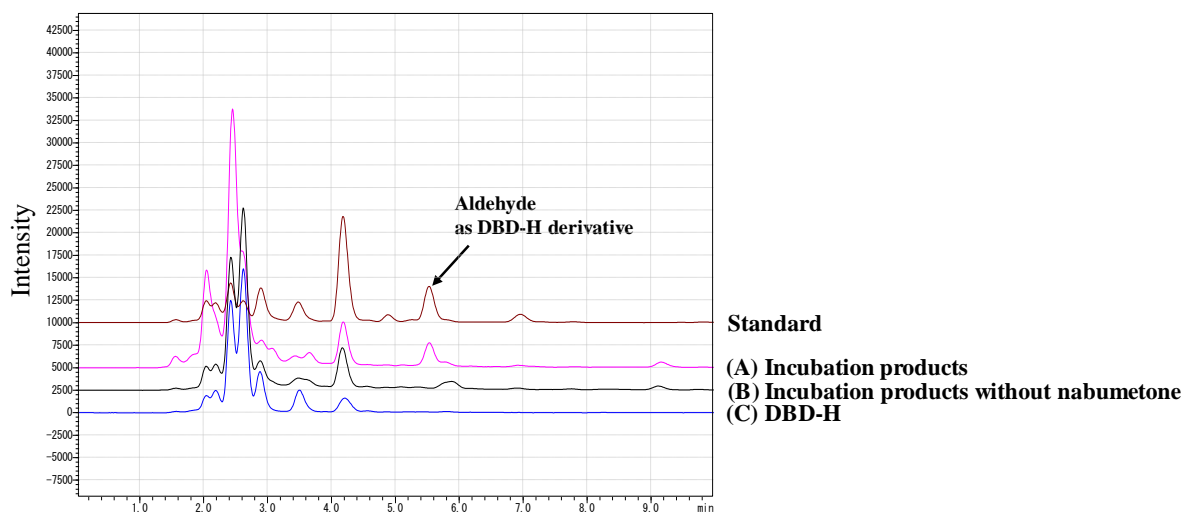


Fig. 11 HPLC chromatograms of an aldehyde as DBD-H derivative for standard (6-MN-CHO: 0.5 μ M) and samples (A and B), and DBD-H alone (C).

Samples obtained from the incubations of the products by hFMO5 with (A) or without (B) nabumetone in human liver cytosol, DF (1mM; final concentration) and DBD-H.

1-3-2 Nabumetone から 3-hydroxyl-4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)butan-2-one (3-OH-NAB) を介した 6-MNA への変換に関する検討

1-3-2-1 ヒト CYP 発現系マイクロソームを用いた nabumetone の *in vitro* 代謝実験

Nabumetone から nabumetone の 3-ヒドロキシ体である 3-OH-NAB が生成するかを検証するため、ヒト CYP 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。ヒト肝マイクロソームと同様に、CYP 発現系マイクロソームでは 6-MNA の生成は観察されなかったが、いくつかの CYP 分子種では 3-OH-NAB が生成した (Fig. 12)。3-OH-NAB の生成が確認されたのは、CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4 および CYP3A5 であった。CYP3A5 はヒト肝マイクロソーム中の含量が非常に少ないことから [45]、ヒト肝では主に CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4 が nabumetone から 3-OH-NAB の変換に関与していることが示唆された。

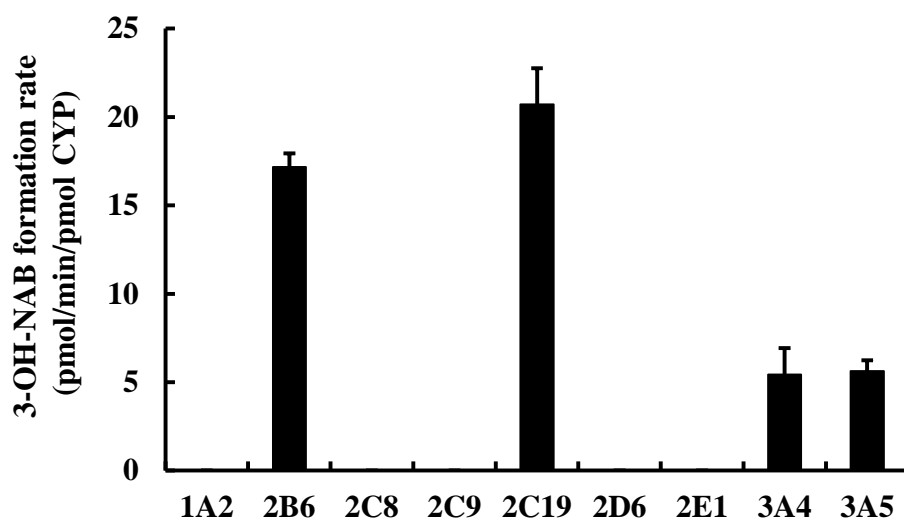


Fig. 12 3-OH-NAB formation from nabumetone by cDNA-expressed CYPs.

Each bar represents the mean \pm S.D. (n=3).

1-3-2-2 ヒト肝マイクロソーム, S9 および凍結ヒト遊離肝細胞を用いた 3-OH-NAB の *in vitro* 代謝実験

1-3-2-1 の結果から、nabumetone から 3-OH-NAB が生成することが明らかになった。Varfaj らは 3-OH-NAB が、CYP による nabumetone から 6-MNA への一連の代謝の中間代謝物であると報告している [20]。一方、我々の前項までの検討結果では、nabumetone から 6-MNA への活性化反応は、CYP だけでは進まないことが示唆された。そこで、ヒト肝 S9、マイクロソームおよび凍結ヒト遊離肝細胞を用いて 3-OH-NAB から 6-MNA が生成するかどうかを検討した。

各種酵素源と補酵素を用いた 3-OH-NAB の代謝実験の結果を Table 5 に示す。凍結ヒト遊離肝

細胞では、3-OH-NAB から 6-MNA の生成が観察された（付録 1 参照，p.115）が，ヒト肝ミクロソームと S9 では観察されなかった．凍結ヒト遊離肝細胞で 6-MNA の生成が確認されたことから，3-OH-NAB は nabumetone から 6-MNA への経路の中間代謝物である可能性が示唆された．

3-OH-NAB を基質として S9 画分に種々補酵素を添加して代謝実験を行ったところ，いずれの条件でも 6-MNA は生成しなかったが，3-OH-NAB の炭素鎖中のケトンが還元された 6-MN-diol が主に生成した．6-MN-diol は NADPH および NADH を補酵素として用いたときに多く観られた（6-MN-diol の定量的な結果が得られていないため，データは示さない）．このことから，S9 中では 3-OH-NAB の還元が主な経路となり，6-MNA への経路は観察できない可能性が考えられた．Nabumetone と同様に 3-OH-NAB の代謝は，補酵素要求性の異なる複数の酵素が関与しており，6-MNA の生成には複数の中間代謝物を經由している可能性が示唆された（Fig. 13）．

Table 5 Formation of 6-MNA in incubations of 3-OH-NAB with human microsomes, S9 and cryopreserved hepatocytes under various incubation conditions.

Enzyme source and coenzyme	6-MNA formation rate
Microsomes + NADPH	n.d.
S9 + NADPH	n.d.
S9 + NADH	n.d.
S9 + NADP⁺	n.d.
S9 + NAD⁺	n.d.
Hepatocytes	38.7 (pmol/min/10⁶ cells)

Data represent the average of duplicate experiments.
n.d., Not detected (Below the detection limit)

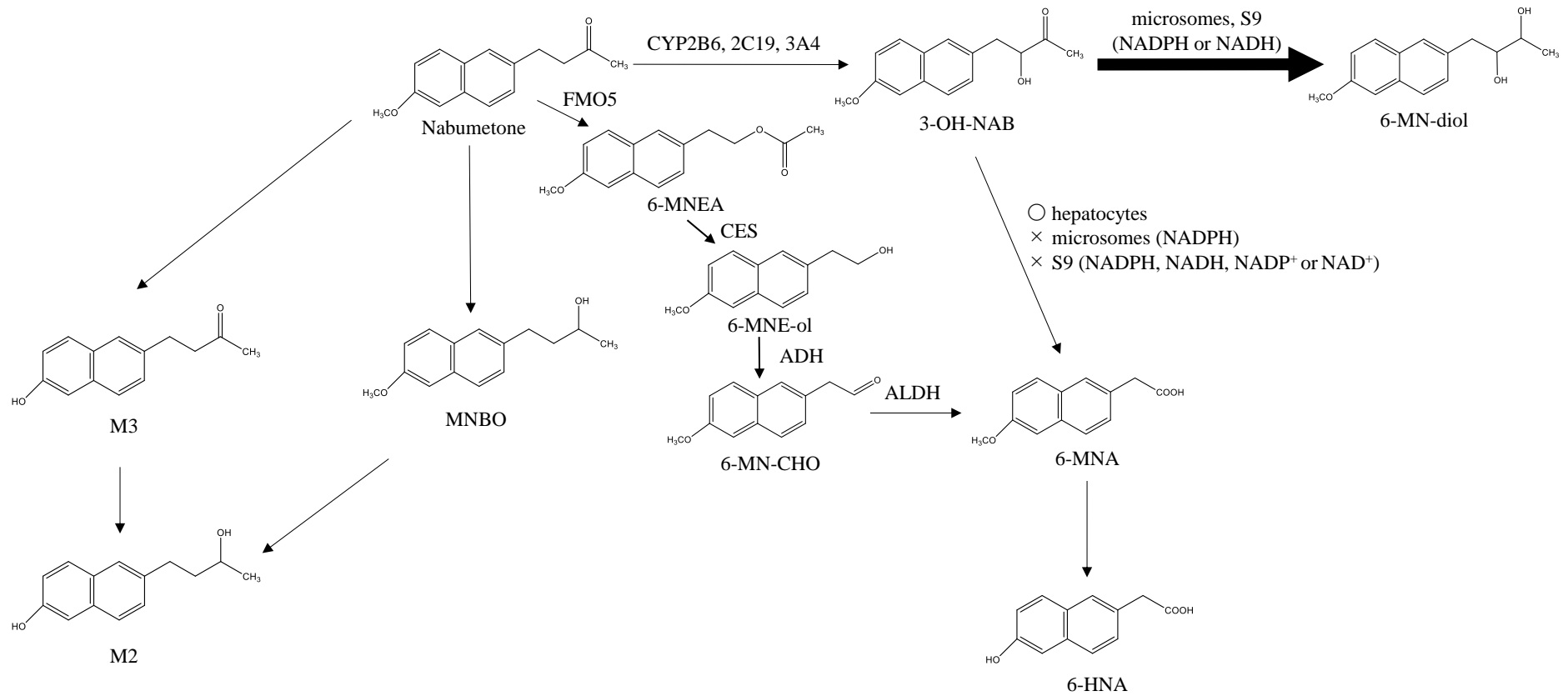


Fig. 13 Proposed metabolic pathways of nabumetone in human.

1-3-2-3 3-OH-NAB のヒト FMO 発現系マイクロソーム *in vitro* 代謝実験の反応液を基質溶液としたヒト肝マイクロソーム, サイトゾルおよび S9 を用いた *in vitro* 代謝実験 (2 段階代謝実験)

Nabumetone は CYP により 3-OH-NAB を経て 6-MNA を生成するとの報告がある [20]. 一方, 我々の前項までの検討結果は, nabumetone から CYP により 3-OH-NAB が生成すること (1-3-2-1), しかし, nabumetone から 6-MNA への活性化反応は, CYP だけでは進まないこと (1-3-1-1) を示唆した. ヒト FMO5 を用いた nabumetone の代謝実験結果 (1-3-1-3) では, nabumetone は Baeyer-Villiger 酸化を受けたエステル体を経て, 6-MNA に変換されることが示唆されている. 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 段階代謝実験を行った. なお, 3-OH-NAB を基質としたヒト肝 S9 およびマイクロソームの代謝実験では, 3-OH-NAB の還元体 6-MN-diol が主生成物で, 6-MNA の生成は認められないことが判明している (1-3-2-2).

ヒト FMO1, FMO3 および FMO5 発現系マイクロソームを用いて代謝実験を行った反応液を HPLC に注入したところ, わずかに 6-MN-diol が検出されたが, 他の代謝物は検出されなかった. そこで, 反応液にさらにヒト肝 S9 と補酵素を添加して代謝実験 (2nd incubation) を行った. ヒト FMO1, FMO3 または FMO5 発現系マイクロソームを用いた 3-OH-NAB の代謝実験 (1st incubation) の反応液にヒト肝 S9 と補酵素として NAD⁺を加えて 2 段階代謝実験を行ったときの HPLC クロマトグラムを Fig. 14 に示す. Nabumetone を基質として同様の検討を行ったとき (1-3-1-3) と同じく, 3-OH-NAB の場合も FMO5 発現系マイクロソームを用いた場合にのみ 6-MNA の生成が確認された.

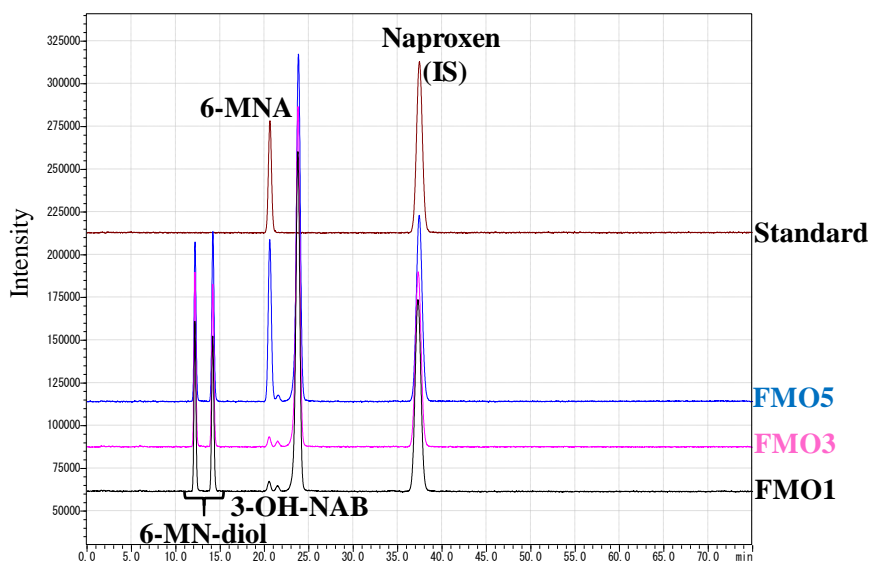


Fig. 14 HPLC chromatograms of the standard and samples obtained from the 60 min incubations of the incubation products of 3-OH-NAB by hFMOs with human liver S9.

The concentration of standard (6-MNA) was 1 μ M.

次に、種々阻害剤 (Table 3 再掲) を添加して、3-OH-NAB のヒト FMO5 発現系ミクロソームとヒト肝 S9 の 2 段階代謝実験を行った。結果を Fig. 15 に示す。ALDH の阻害剤 DF, AADAC の阻害剤 eserine, PON の阻害剤 EDTA および serine esterase/protease の阻害剤 AEBSF を添加したとき、6-MNA の生成はそれぞれコントロールに対して 73.2, 72.2, 81.7 および 35.1%に低下した。

Table 3 Inhibitors used in the inhibition studies. (p. 18 再掲)

Inhibitor	Concentration (mM)	Enzyme	Enzyme Source	Cofactor
Disulfiram (DF)	1	aldehyde dehydrogenase (ALDH)	microsomes, cytosol	NAD ⁺ , NADP ⁺
Menadione (MD)	0.1	aldehyde oxidase (AO)	cytosol	not required
Bis(<i>p</i> -nitrophenyl) phosphate (BNPP)	1	carboxylesterase (CES)	microsomes, cytosol	not required
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	1	carboxylesterase (CES)	microsomes, cytosol	not required
Eserine	1	arylacetamide deacetylase (AADAC)	microsomes	not required
EDTA	1	paraoxonase (PON)	microsomes	not required
4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF)	4	serine esterase/protease	microsomes, cytosol	not required

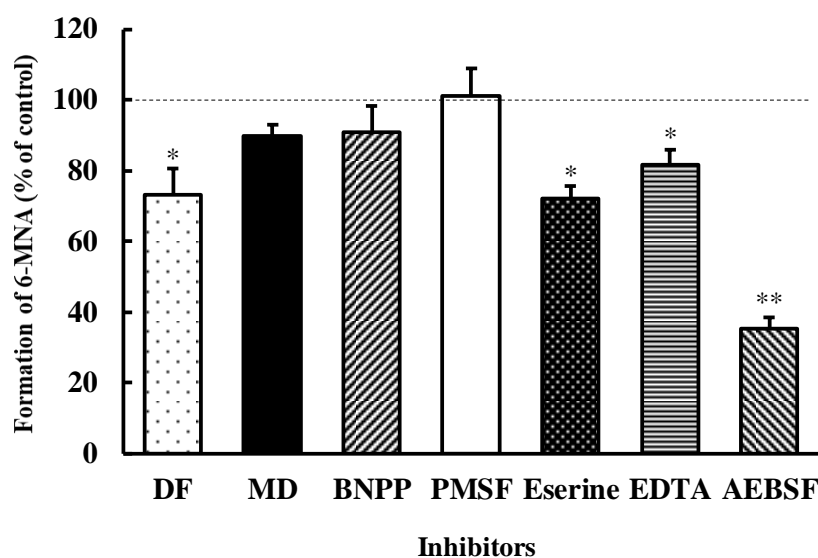


Fig. 15 Inhibition studies of formation of 6-MNA from the incubation products of 3-OH-NAB by hFMO5 with human liver S9.

Each bar represents the mean \pm S.D. (n=3). * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, compared with no treatment of each inhibitor.

さらに、ヒト FMO5 と 3-OH-NAB の代謝実験 (1st incubation) を行った反応液に、ヒト肝ミクロソームおよびサイトゾルを用いて代謝実験 (2nd incubation) を行い、反応液中の生成物から 6-MNA の変換を触媒する酵素の補酵素要求性について確認した。結果を Fig. 16 に示す。ヒト肝ミクロソームとサイトゾル両方で 6-MNA の生成が観察されたが、細胞画分 (酵素源) を添加しな

い場合は、6-MNA の生成が観察されなかった（データは示さない）。ミクロソームおよびサイトゾル中では補酵素なしでも 6-MNA が生成したが、 NAD^+ を添加した方が 6-MNA の生成が多かった。一方、 NADPH を添加したときは 6-MNA の生成が NAD^+ を添加時に比べて少なかった（付録 1 参照, p. 115）。

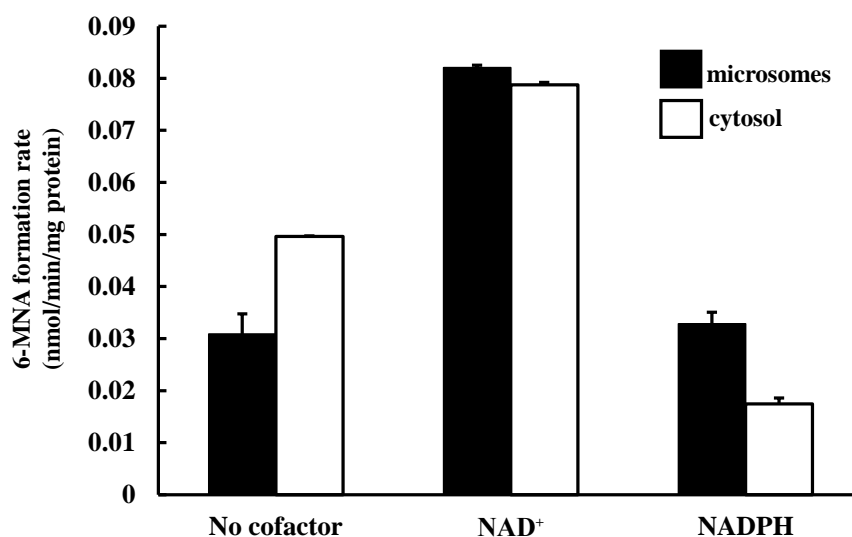


Fig. 16 Formation of 6-MNA after 60 min incubations of the incubation products of 3-OH-NAB by hFMO5 with human liver microsomes or cytosol under various incubation conditions. Each bar represents the mean \pm S.D. (n=3).

以上の結果より、ヒト FMO5 発現系ミクロソームで生成した 3-OH-NAB の代謝物から 6-MNA の変換には、 NAD^+ 要求性の ALDH および何らかの加水分解酵素が関与していることが示唆された。

1-3-2-4 ヒト ALDH および AO 発現系サイトゾルを用いた *in vitro* 代謝実験および阻害実験

3-OH-NAB のヒト FMO5 発現系ミクロソーム *in vitro* 代謝実験の反応液を基質溶液として、ヒト ALDH および AO 発現系サイトゾルを用いて代謝実験を行った結果を Fig. 17 に示す。ALDH および AO 発現系サイトゾルの両方で 6-MNA の生成が確認された。ALDH 発現系サイトゾルを用いた代謝実験の反応液に ALDH の阻害剤である DF を添加すると 6-MNA の生成がコントロール（阻害剤非添加）の 16.4%まで阻害された。一方、AO 発現系サイトゾルを用いた代謝実験の反応液に AO の阻害剤である MD および RF を添加したところ、阻害されなかったことから、AO の関与は低いものと考えられた。これらの結果から、3-OH-NAB の FMO5 による代謝物から 6-MNA の生成には ALDH の関与していることが示唆された。

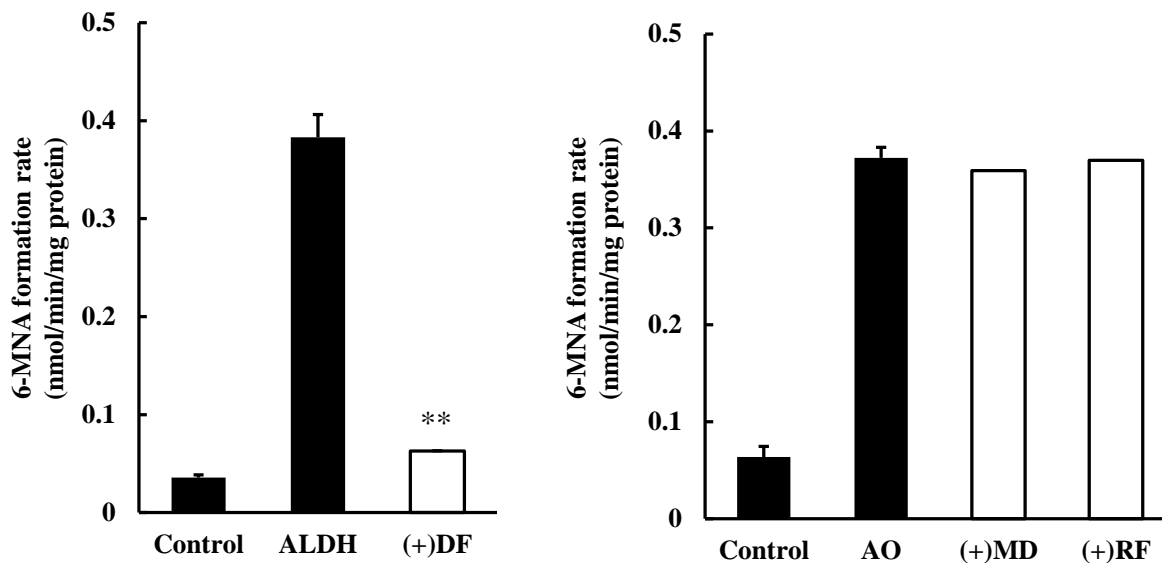


Fig. 17 Formation of 6-MNA after 60 min incubations of the incubation products of 3-OH-NAB by hFMO5 with cDNA-expressed ALDH or AO. Each bar represents the mean \pm S.D. (n=3). * p < 0.001, compared with no treatment of each inhibitor.

1-3-2-5 3-OH-NAB のヒト FMO5 発現系マイクロソーム *in vitro* 代謝実験の反応液中の反応中間体 6-MN-CHO の確認

Fig. 14 に示した通り，ヒト FMO5 発現系マイクロソームで生成した 3-OH-NAB の代謝物を基質としたヒト肝 S9 の代謝実験の HPLC クロマトグラムには，アルデヒド体 (6-MN-CHO) は検出されなかった．そこで，nabumetone のとき (1-3-1-4-2) と同様に，HPLC 用アルデヒドラベル化試薬 DBD-H を用いる方法でアルデヒド体の検出を試みた．Fig. 18 に示すように，FMO5 を用いた 3-OH-NAB の代謝実験の反応液の HPLC クロマトグラム上にアルデヒド体 (6-MN-CHO) と DBD-H の複合体のピークが観察され，アルデヒド体の生成が確認できた．

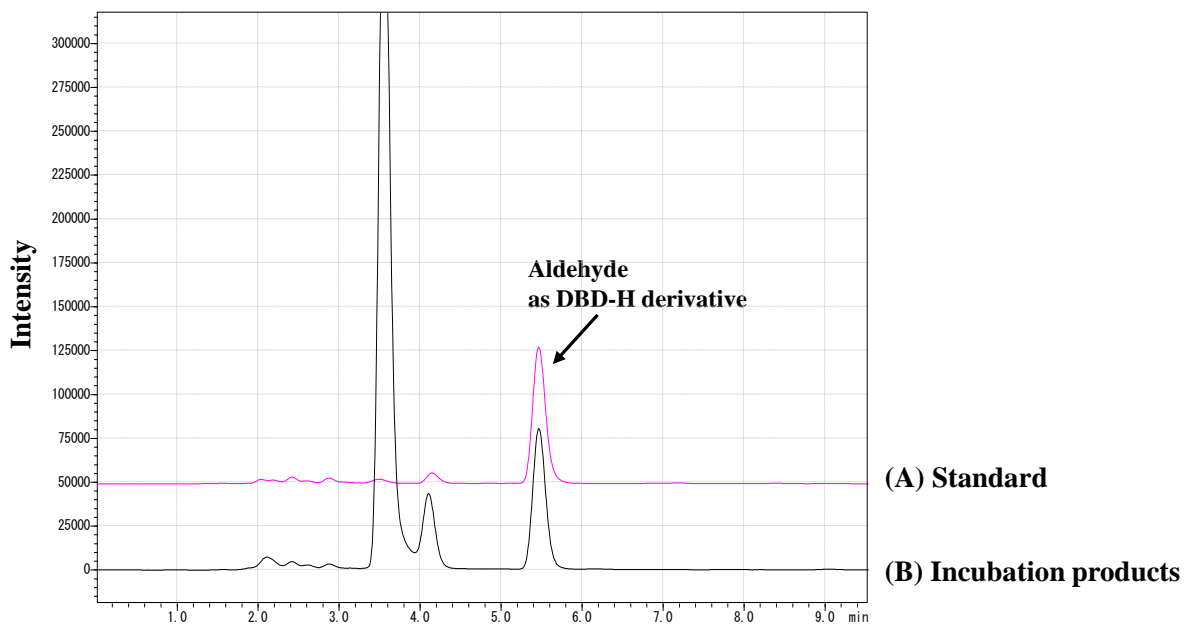


Fig. 18 HPLC chromatogram of aldehyde as DBD-H derivative for standard (6-MN-CHO: 10 μ M) (A) and incubation products which obtained from cDNA-expressed hFMO5 incubated with 3-OH-NAB (B).

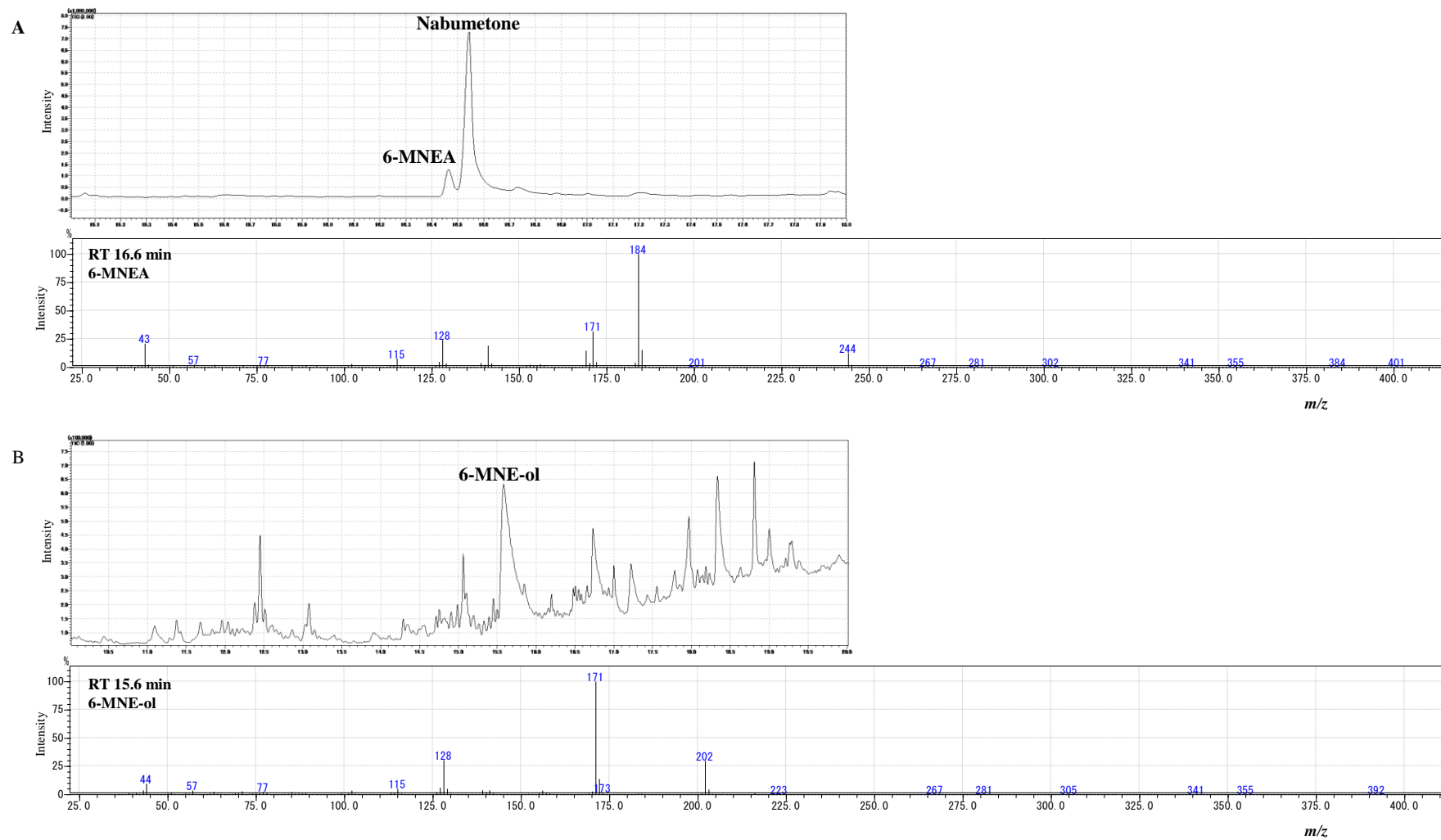


Fig. 19 GC/MS chromatograms obtained from the 1 hr (A) or 16 hr (B) incubations of nabumetone with cDNA-expressed hFMO5 (0.5 mg protein/mL).

第4節 小括

Nabumetone から 6-MNA に至る経路の代謝反応特性を明らかにするために、まず、ヒト肝マイクロソーム、S9 および凍結ヒト遊離肝細胞を用いて nabumetone の代謝実験を行った。凍結ヒト遊離肝細胞では 6-MNA の生成が観察されたが、ヒト肝マイクロソームおよび S9 を用いたときは 6-MNA は観察されなかった。Turpeinen らと Varfaj らは、nabumetone から 6-MNA の代謝には CYP1A2 が関与していると報告しているが [19,20]、今回我々が CYP1A2 発現系マイクロソームを用いて行った nabumetone の代謝実験では、6-MNA は生成しなかった。Nobilis らと Varfaj らは、nabumetone は 3-ヒドロキシ体 3-ON-NAB を経由して 6-MNA に変換されると報告している [20,21]。CYP 発現系マイクロソームを用いた nabumetone の代謝実験では、6-MNA は観られなかったが、CYP2B6、CYP2C19 および CYP3A4 で 3-OH-NAB の生成が観察された。そこで、3-OH-NAB は中間代謝物であると考え、3-OH-NAB についても nabumetone と同様にヒト肝マイクロソーム、S9 および凍結ヒト遊離肝細胞を用いて代謝実験を行ったところ、6-MNA の生成が凍結ヒト遊離肝細胞で観察され、ヒト肝マイクロソームおよび S9 では観察されなかった。以上のことから nabumetone から 6-MNA の変換経路には、補酵素が異なる複数の酵素が関与しており、複数の中間代謝物を経由している可能性が示唆された。また、3-OH-NAB は nabumetone から 6-MNA の変換過程の中間代謝物であることが示唆された。

次に、Fiorentini らの報告 [22] を検証するために、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 のカルボニル基の隣に酸素原子が挿入された nabumetone のエステル体である 6-MNEA が検出された。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、BVMO の基質である 4-MP-one で nabumetone から 6-MNEA の生成が競合的に阻害されたことから、ヒト FMO5 は nabumetone から 6-MNEA の Baeyer-Villiger 酸化を触媒することが確認できた。

さらに、6-MNEA 以降の代謝反応を検討するために、nabumetone を FMO5 で反応させた反応液 (1st incubation) にヒト肝 S9、マイクロソームまたはサイトゾルと補酵素を加えて代謝実験 (2nd incubation) を行ったところ、6-MNA が生成した。また、2nd incubation の酵素と補酵素にサイトゾルと NAD⁺を用いたときが最も多かったことから、サイトゾル中に存在する NAD⁺を補酵素とする酵素の関与が示唆された。さらに、化学阻害剤を用いた阻害実験の結果から、nabumetone から 6-MNEA を介した 6-MNA の変換には、CES、ADH および ALDH の関与が明らかになった。

また、methoxyamine および HPLC 用アルデヒドラベル化試薬を用いてアルデヒド体の検出を試みたところ、中間代謝物としてアルデヒド体 (6-MN-CHO) が存在していることが明らかになった。

以上のことから、nabumetone から 6-MNA への変換は、まず FMO5 による Baeyer-Villiger 酸化によりエステル体 (6-MNEA) が生成し、次に CES により加水分解されてアルコール体 (6-MNE-ol) となり、さらに 6-MNE-ol が ADH によりアルデヒド体 (6-MN-CHO) となり、最後に 6-MN-CHO が ALDH により 6-MNA と変換していることが明らかになった。

3-OH-NAB もその化学構造から nabumetone と同様に、Baeyer-Villiger 酸化が活性化のエントリーポイントとなっていると予測し、FMO5 を用いて 3-OH-NAB の代謝実験を行った。3-OH-NAB と FMO5 の反応液を HPLC に注入したところ、還元されたジオール体が検出されたが、他の代謝物は検出されなかった。さらに、3-OH-NAB と FMO5 を反応させて生成した代謝物に、S9 を添加すると 6-MNA が生成した。一方、FMO1 および FMO3 を用いたときは、6-MNA の生成が観察されなかったことから、FMO5 に特異的な反応であることが明らかになった。また、3-OH-NAB と FMO5 を反応させて生成した代謝物に、サイトゾルと補酵素として NAD^+ を添加した場合に最も 6-MNA が生成した。さらに、化学阻害剤を用いた阻害実験の結果から、3-OH-NAB から 6-MNA の変換には、何らかの加水分解酵素および ALDH の関与が示唆された。3-OH-NAB と FMO5 を反応させた反応液に ALDH 発現系サイトゾルを添加して代謝実験を行ったところ、6-MNA が生成した。また、3-OH-NAB と FMO5 を反応させた反応液に HPLC 用アルデヒドラベル化試薬を添加することにより、アルデヒド体 (6-MN-CHO) が検出できた。

以上のことから、3-OH-NAB はまず FMO5 による Baeyer-Villiger 酸化によりエステル体を生成し、これが加水分解酵素によりアルデヒド体 (6-MN-CHO) に変換され、さらに、ALDH により 6-MNA へと変換していることが明らかになった。3-OH-NAB のエステル体は検出できなかったが、酸化剤である *m*-chloroperoxybenzoic acid (mCPBA) を用いて化学的に 3-OH-NAB の Baeyer-Villiger 酸化を行ったところ、アルデヒド体 (6-MN-CHO) に酸素原子が挿入された (6-methoxynaphthalen-2-yl)methyl formate が観察された。この結果は、3-OH-NAB から Baeyer-Villiger 酸化で生成した 3-OH-NAB のエステル体を経由してアルデヒド体が、さらに Baeyer-Villiger 酸化を受けて (6-methoxynaphthalen-2-yl)methyl formate が生成したと考えられる (Fig. 20)。化学的に Baeyer-Villiger 酸化を受けてエステル体を生成することから、ヒト FMO5 でも 3-OH-NAB は Baeyer-Villiger 酸化によりエステル体を生成するが、3-OH-NAB のエステル体は生成後速やかに加水分解されアルデヒド体になるために検出できなかったと考えられた。

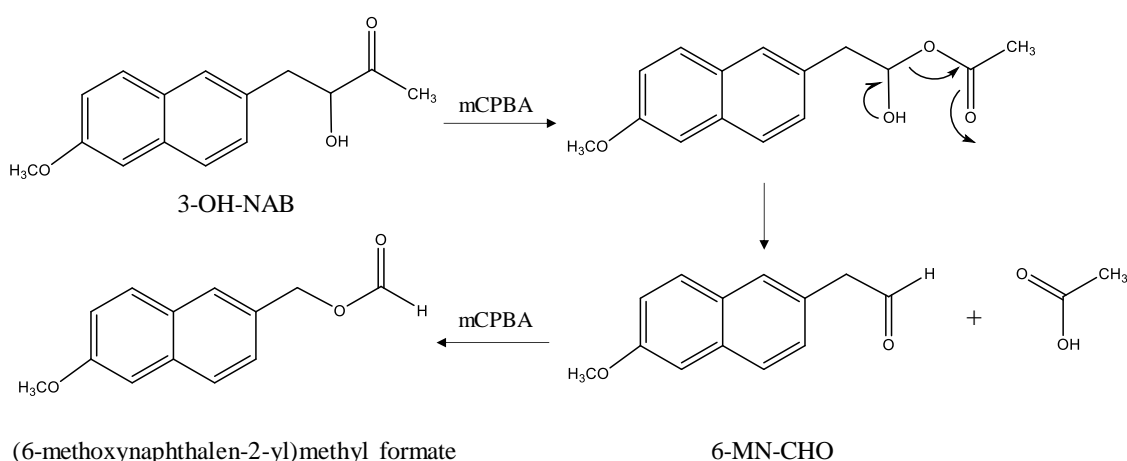


Fig. 20 Baeyer-Villiger oxidation of 3-OH-NAB by mCPBA.

第1章を小括すると、nabumetone から 6-MNA への活性化代謝には、2つの多段階の反応経路が存在することが明らかになった。第1の経路は、nabumetone が FMO5 による Baeyer-Villiger 酸化によりエステル体となり、その後加水分解され、次いで酸化反応により 6-MNA が生成する経路である。第2の経路は 3-OH-NAB を経由する経路であり、nabumetone から CYP により 3-OH-NAB が生成し、これが FMO5 による Baeyer-Villiger 酸化を受けてエステル体となり、その後の加水分解、酸化反応により 6-MNA が生成する経路である (Fig. 21)。

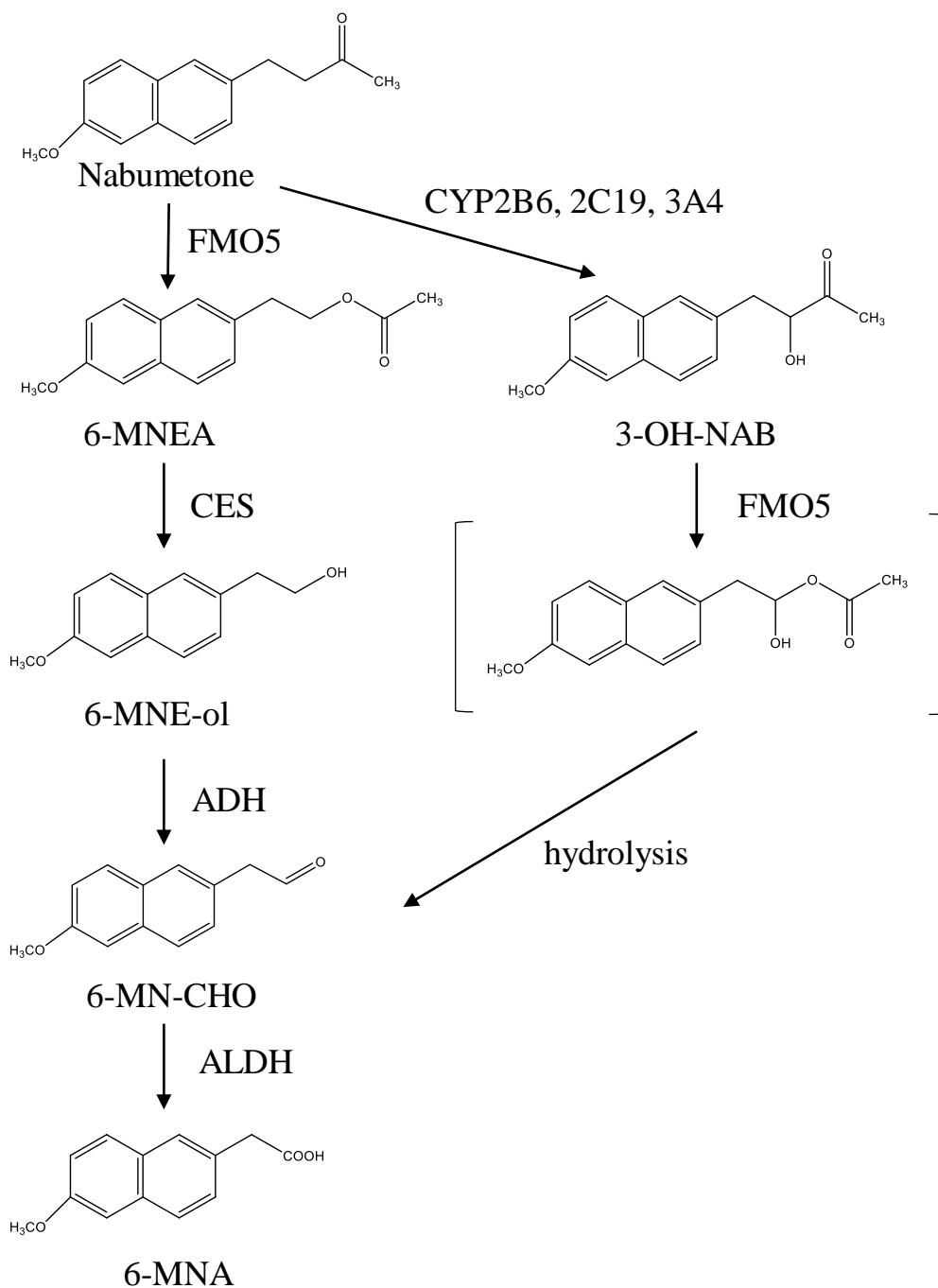


Fig. 21 Metabolic pathway proposed of 6-MNA from nabumetone in human.

第2章 活性代謝物 6-MNA の不活化代謝に関する検討

第1節 緒言

Nabumetone の主要循環代謝物は 6-methoxy-2-naphthylacetic acid (6-MNA) であり、ヒトに ^{14}C -nabumetone を経口投与後、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-hydroxy-2-naphthylacetic acid (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 [18]。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が、関与する酵素の詳細はわかっていない (Fig. 22)。

第2章では、はじめに活性代謝物 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、以下の5つのアプローチで *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も検討した。

1) ヒトおよびラットの CYP 発現系ミクロソームを用いて 6-MNA から 6-HNA への 6-O-脱メチル化を触媒する酵素分子種を推定した。

2) ヒトおよびラットの肝ミクロソームおよび CYP 発現系ミクロソームを用いて 6-MNA から 6-HNA への 6-O-脱メチル化の速度論的解析を行い、酵素キネティックパラメータを算出した。

3) ヒトおよびラットの肝ミクロソームを用いて 6-MNA と数種の CYP 阻害剤、CYP 抗体、または NADPH-P450 reductase 抗体を併用したときの 6-MNA の 6-O-脱メチル化に対する阻害の影響を評価した。

4) ヒトおよびラットの肝ミクロソームを用いて 6-MNA と CYP 活性化剤を併用したときの 6-MNA の 6-O-脱メチル化に対する CYP 活性化剤の影響を評価した。

5) ヒト個別ミクロソームを用いて 6-MNA と 1 - 4) から推定した 6-MNA の 6-O-脱メチル化酵素の特異的基質の反応速度の相関性を評価した。

さらに、1 - 4) から推定した 6-MNA の 6-O-脱メチル化酵素の特異的基質の代謝に及ぼす 6-MNA の影響を検討するため阻害試験を行い、6-MNA が他の併用薬物の代謝に変化を与える可能性を評価した。

次に、ヒトにおける 6-MNA から 6-HNA への酸化的代謝に対する遺伝子多型の影響について検討するために、以下の3つのアプローチで *in vitro* 代謝実験を行った。

1) 野生型および遺伝子変異型のヒト CYP 発現系ミクロソームを用いて 6-MNA から 6-HNA への 6-O-脱メチル化の速度論的解析を行い、酵素キネティックパラメータを算出した。

2) 遺伝子型が決定された個別ヒト肝ミクロソームを用いて、6-MNA から 6-HNA への 6-O-脱メチル化の速度論的解析を行い、酵素キネティックパラメータを算出した。

3) 推定した 6-MNA の 6-O-脱メチル化酵素の特異的基質の代謝に及ぼす 6-MNA の阻害の程度を検討するため、野生型と遺伝子変異型のヒト CYP 発現系ミクロソームおよび遺伝子型が決定された個別ヒト肝ミクロソームを用いて阻害試験を行った。

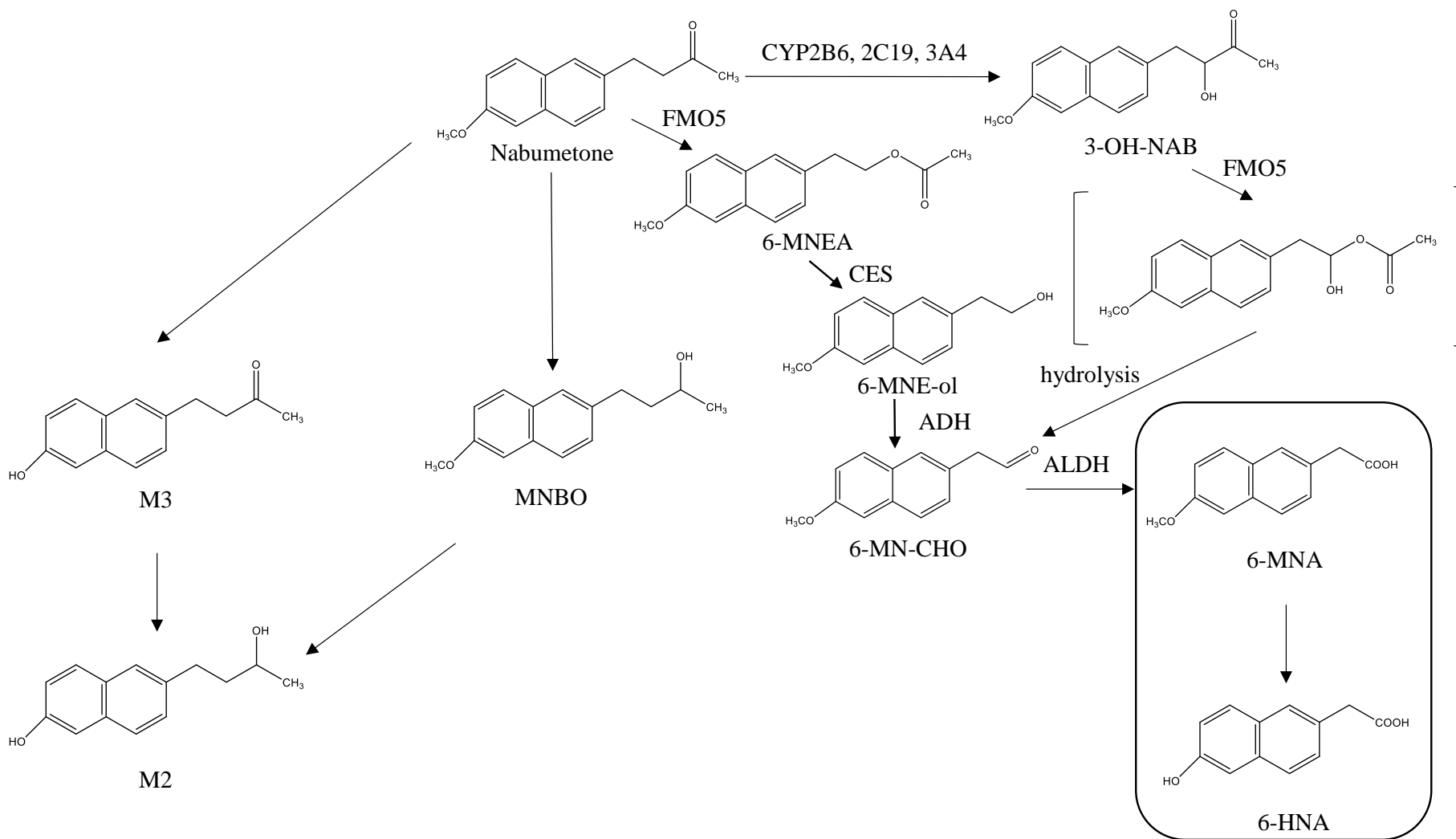


Fig. 22 Proposed metabolic pathways of nabumetone in human [18] .

第2節 実験材料と実験方法

2-2-1 試薬, 酵素源および抗体

6-HNA は三和化学研究所 (名古屋) から供与された.

Diclofenac は LKT Laboratories, Inc., 4'-hydroxydiclofenac は Calbiochem (Darmstadt, Germany), mefenamic acid は東京化成工業より購入した.

Methimazole および dapsone は Sigma-Aldrich Co. LLCより購入した. Thiourea は和光純薬工業より購入した. SKF525A は BIOMOL Research Laboratories, Inc. (Plymouth Meeting, PA, USA) より購入した.

S-warfarin は Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA), 7-hydroxywarfarin は Santa Cruz Biotechnology, Inc.より購入した.

15 ドナープールドヒト肝ミクロソーム (HMMC-PL020) は CellzDirect (Phoenix, AZ, USA), ラット肝ミクロソーム (Sprague-Dawley, 雄または雌) と個別ヒト肝ミクロソーム (HG3, HG74, HG95, HH13, HH47, HK37, HH18, HH809, HH519) は BD Gentest Co. (Woburn, MA, USA) より購入した. 個別ヒト肝ミクロソーム (H0465) は Sekisui XenoTech, LLC. (Kansas City, KS, U.S.A) より購入した.

CYP 発現系ミクロソームは, バキュロウイルス感染昆虫細胞に発現させたもの (CYP1A1, CYP1A2, CYP2A1, CYP2A2, CYP2A6, CYP2B1, CYP2B6, CYP2C6, CYP2C8, CYP2C9.1, CYP2C11, CYP2C12.1, CYP2C13, CYP2C19, CYP2D1, CYP2D2, CYP2D6.1, CYP2E1, CYP3A1, CYP3A2, CYP3A4, CYP4A11) を BD Gentest Co.より購入した. 遺伝子多型の影響の検討では, CYP 発現系ミクロソームは大腸菌に発現させたもの (CYP2C9.1, CYP2C9.2, CYP2C9.3) を Cypex より購入して用いた. なお, CYP 分子種発現系ミクロソームは NADPH-cytochrome P450 reductase と cytochrome-b5 を共発現させたものまたは NADPH-cytochrome P450 reductase のみを共発現させたものである.

ヒト CYP2C9 に対する阻害抗体 (抗-ヒト CYP2C9 polyclonal 抗体) とラット CYP1A2, CYP2C11 および NADPH-cytochrome P450 reductase に対する阻害抗体 (抗-ラット CYP1A2, CYP2C11 および NADPH P450 reductase polyclonal 抗体) は日本農産工業 (横浜) より購入した.

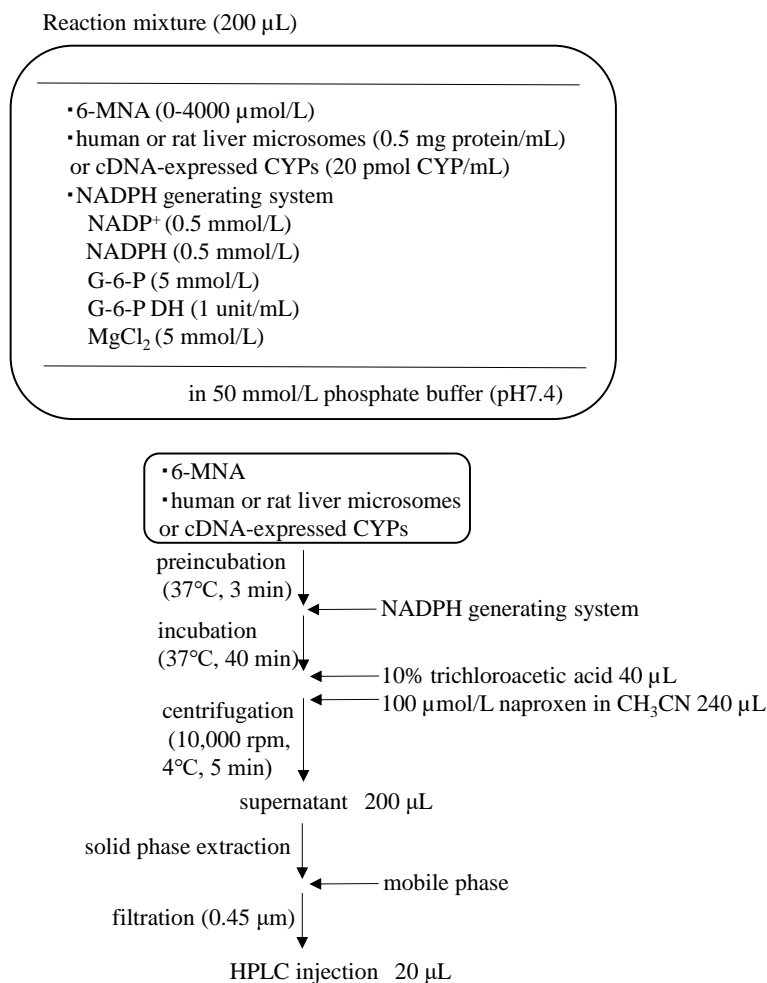
その他の試薬は特級または HPLC 分析用またはそれに相当する試薬を使用した.

2-2-2 肝ミクロソームおよび CYP 発現系ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝実験

ヒトまたは雄ラット肝ミクロソームによる 6-MNA の O-脱メチル化代謝活性は, 6-MNA (0, 50, 100, 200, 400, 1000, 2000, 4000 $\mu\text{mol/L}$), ヒトまたはラット肝ミクロソーム (0.5 mg protein/mL), NADPH 生成系 (0.5 mmol/L NADP⁺, 0.5 mmol/L NADPH, 5 mmol/L G-6-P, 1 unit/mL G-6-P DH, 5 mmol/L MgCl₂) および 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.2 mL の反応液で測定した. 上記の反応液は 37°C, 3 分間プレインキュベーションした後, NADPH 生成系を添加して反応を開始した. 37°C, 40 分間インキュベーションした後, 10%トリクロロ酢酸水溶液 40 μL および内

部標準物質である naproxen の 100 $\mu\text{mol/L}$ アセトニトリル溶液 240 μL を添加して、反応を停止した。その後、4°Cで 10,000 rpm, 5 分間遠心分離し、得られた上清を試料とした。発現系マイクロソームによる代謝試験は、各分子種発現系の濃度を 20 pmol CYP/mL とした。試料は 1-2-2 の方法と同様に前処理を行い、生成した 6-HNA 量を HPLC で測定した (Scheme 10)。

ヒトおよびラットの肝マイクロソームおよび CYP 発現系マイクロソームによる 6-MNA から 6-HNA への 6-O-脱メチル化は Michaelis-Menten 速度論に従ったので、 K_m および V_{max} を、Eadie-Hofstee plot から最小二乗法にて直線回帰することにより算定した。

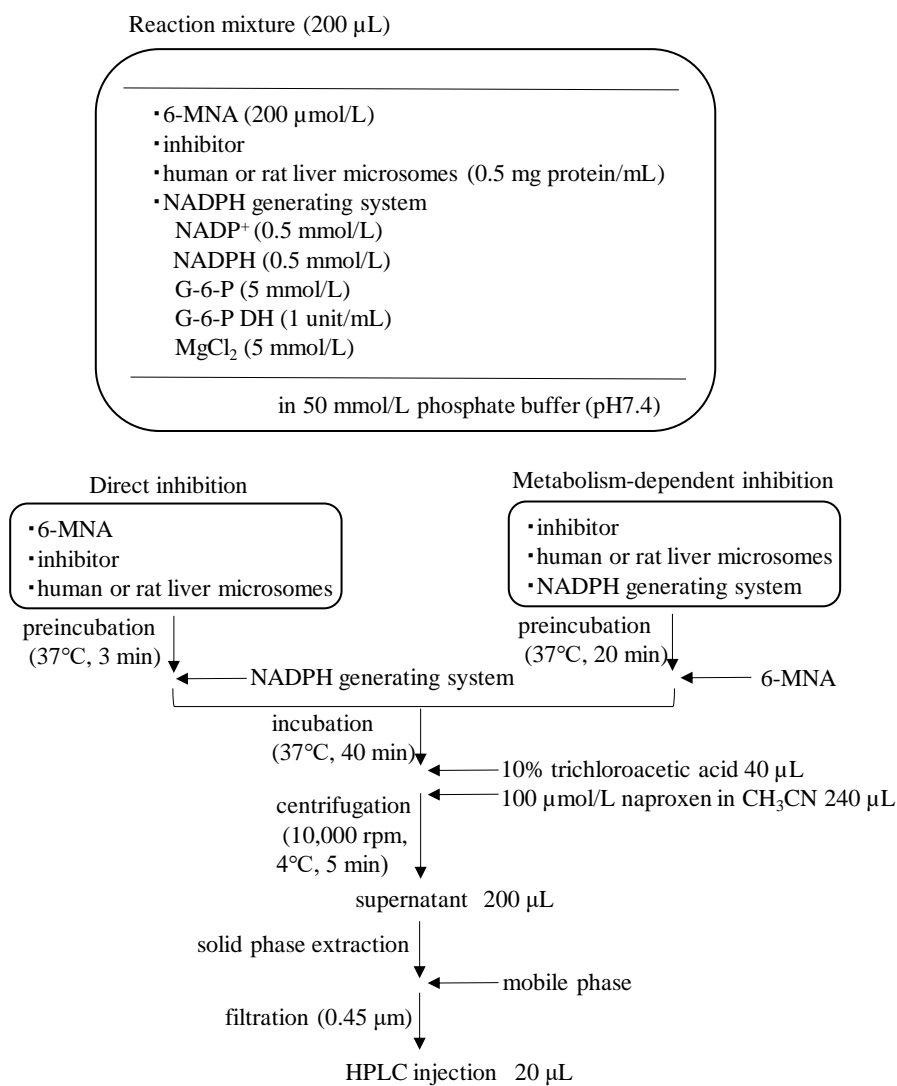


Scheme 10 Procedure of *in vitro* metabolism experiment.

2-2-3 6-MNA の O-脱メチル化代謝活性に対する化学阻害剤の影響

6-MNA の 6-O-脱メチル化代謝活性に対する化学阻害剤の影響は、6-MNA 濃度 200 $\mu\text{mol/L}$ で検討した。反応液に Table 6 の阻害剤 [46-52] を加えて、2-2-2 の手順に従い代謝実験を行った。代謝依存性阻害剤 (mechanism based inhibitor) である furafylline, diethyldithiocarbamate および troleandomycin を用いた阻害実験では基質添加による反応開始の前に、阻害剤をマイクロソームお

よび NADPH 生成系と共に 37°Cで 20 分間プレインキュベーションした。ラット肝ミクロソームは雄性ラットを使用し, cimetidine による阻害実験のみ, 雄および雌ラットミクロソームを用いた。阻害剤の影響は, それぞれ阻害剤非添加のものをコントロールとした (Scheme 11)。



Scheme 11 Procedure of *in vitro* inhibition experiment.

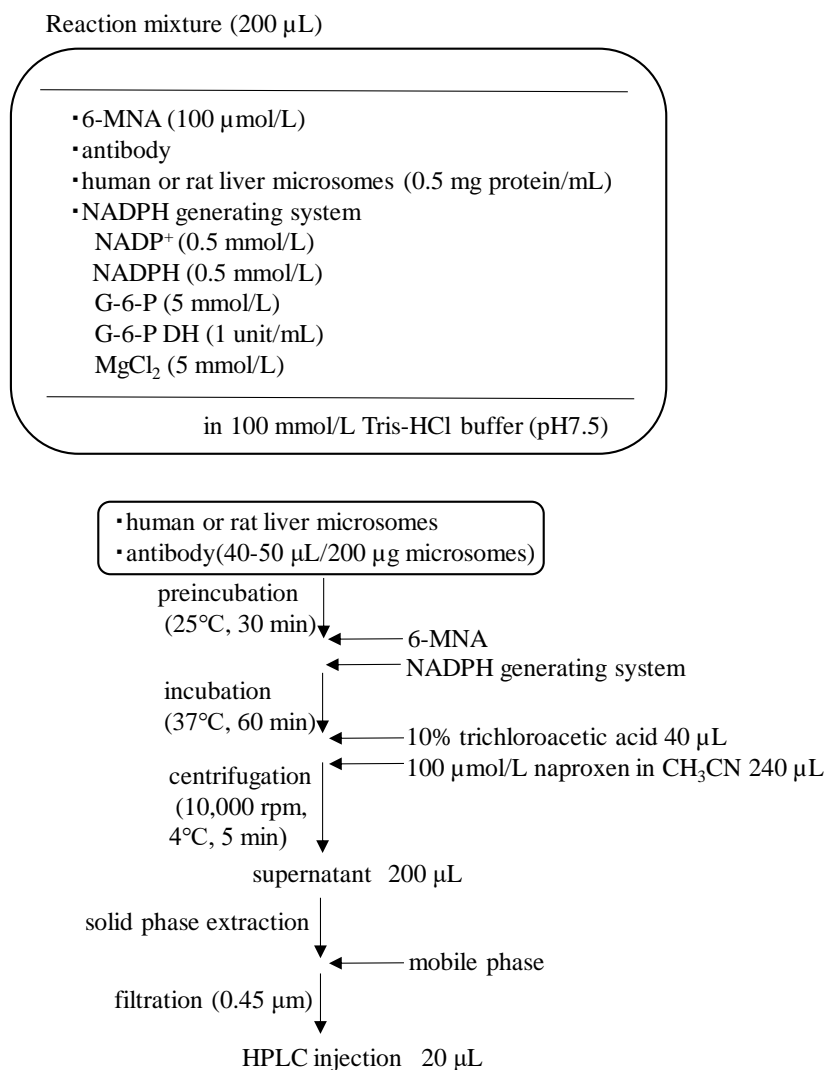
Table 6 Inhibitors used in the inhibition studies on *O*-demethylation of 6-MNA.

Inhibitor	Concentration (mM)	Enzyme
<i>N</i> -Benzylimidazole (NBI)	1	CYP
SKF525A	0.12	CYP
Methimazole	1	FMO
Thiourea	1	FMO
Furafylline*	0.001	CYP1A2
Sulfaphenazole	0.02	CYP2C9
<i>S</i> -Mephenytoin	0.5	CYP2C19
Quinidine	0.005	CYP2D6
Diethyldithiocarbamate*	0.02	CYP2E1
Troleandomycin*	0.001	CYP3A4
Ketoconazole	0.001	CYP3A4
Cimetidine	0.25	CYP2C11/2C6

* : metabolism-dependent inhibitor

2-2-4 6-MNA の *O*-脱メチル化代謝活性に対する阻害抗体の影響

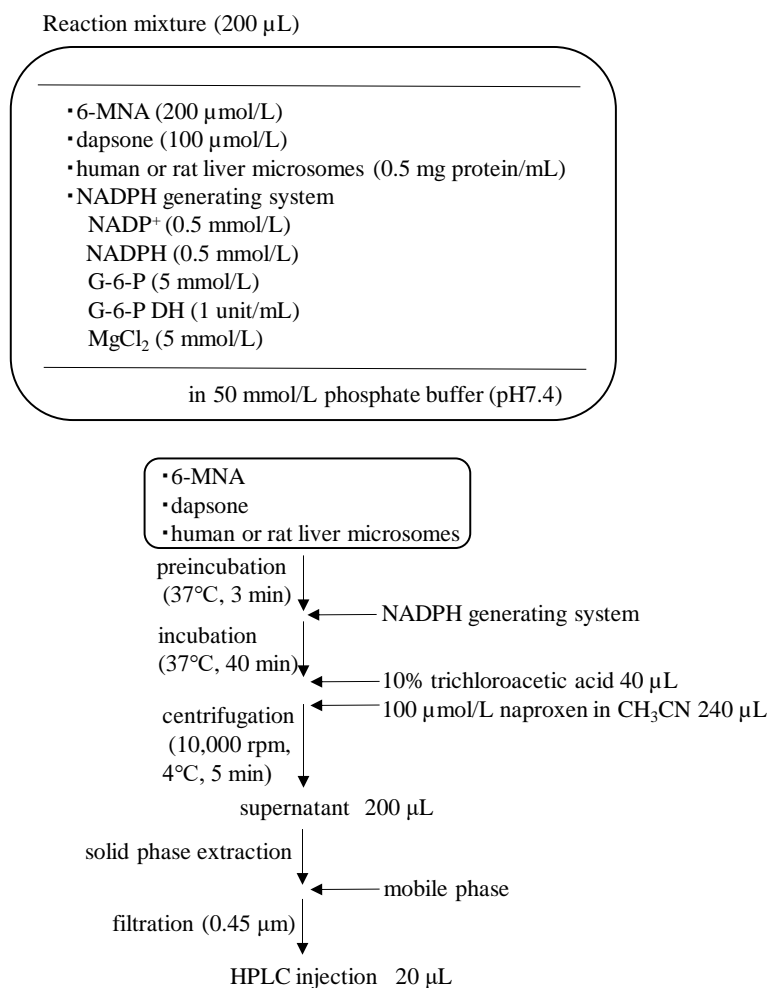
6-MNA の *O*-脱メチル化代謝活性に対する阻害抗体の影響は、以下に示す手順で検討した。ヒトまたはラット肝ミクロソームと種々の濃度の阻害抗体（抗-ヒト CYP2C9, 抗-ラット CYP1A2, CYP2C11 および NADPH P450 reductase polyclonal 抗体）を 25°C, 30 分間プレインキュベーションした後、6-MNA および NADPH 生成系を添加し、37°C で 100 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中でインキュベーションした。6-MNA 濃度は 100 μmol/L, インキュベーション時間は 60 分とした。阻害抗体は、対応する非免疫血清を添加して濃度を調整した。ミクロソーム 200 μg に対する添加量は 40-50 μL である (Scheme 12)。



Scheme 12 Procedure of *in vitro* inhibition experiment using antibody.

2-2-5 6-MNA の *O*-脱メチル化代謝活性に対する dapsone の影響

Dapsone は CYP2C9 の基質薬物の代謝を活性化させることが報告されている [53]. ヒトまたは雄ラット肝ミクロソームによる 6-MNA の *O*-脱メチル化代謝活性に対する dapsone の影響を検討するため、反応液に dapsone を加えて、2-2-2 の手順に従い代謝実験を行った。Dapsone は最終濃度が 100 μ mol/L となるように添加した。6MNA の濃度は 200 μ mol/L とし、dapsone 非添加のものをコントロールとした (Scheme 13).

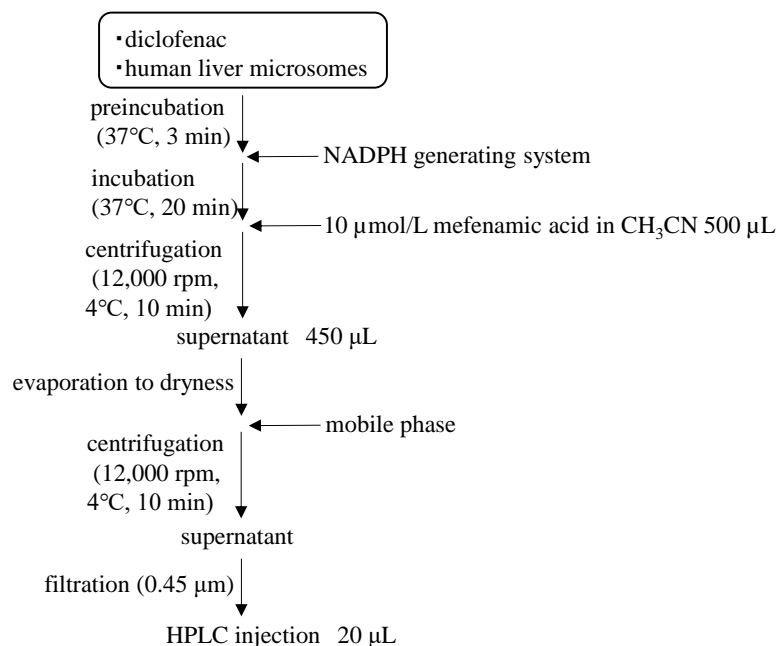
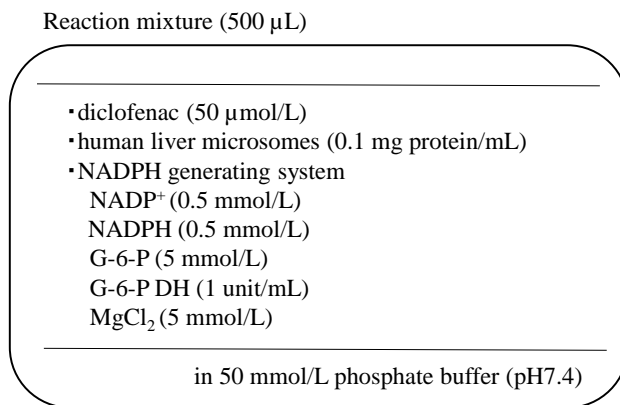


Scheme 13 Procedure of *in vitro* metabolism experiment using dapsone.

2-2-6 6-MNA の *O*-脱メチル化代謝活性と diclofenac の 4'-水酸化活性の相関

6-MNA から 6-HNA への生成速度と CYP2C9 の特異的プローブ基質である diclofenac の 4'-水酸化活性との相関性を、個別ヒト肝ミクロソーム (HG3, HG74, HG95, HH13, HH47, HK37) を用いて検討した。

6MNA 濃度 200 μ mol/L, 6-MNA から 6-HNA への生成速度を 2-2-2 の手順に従い測定した。



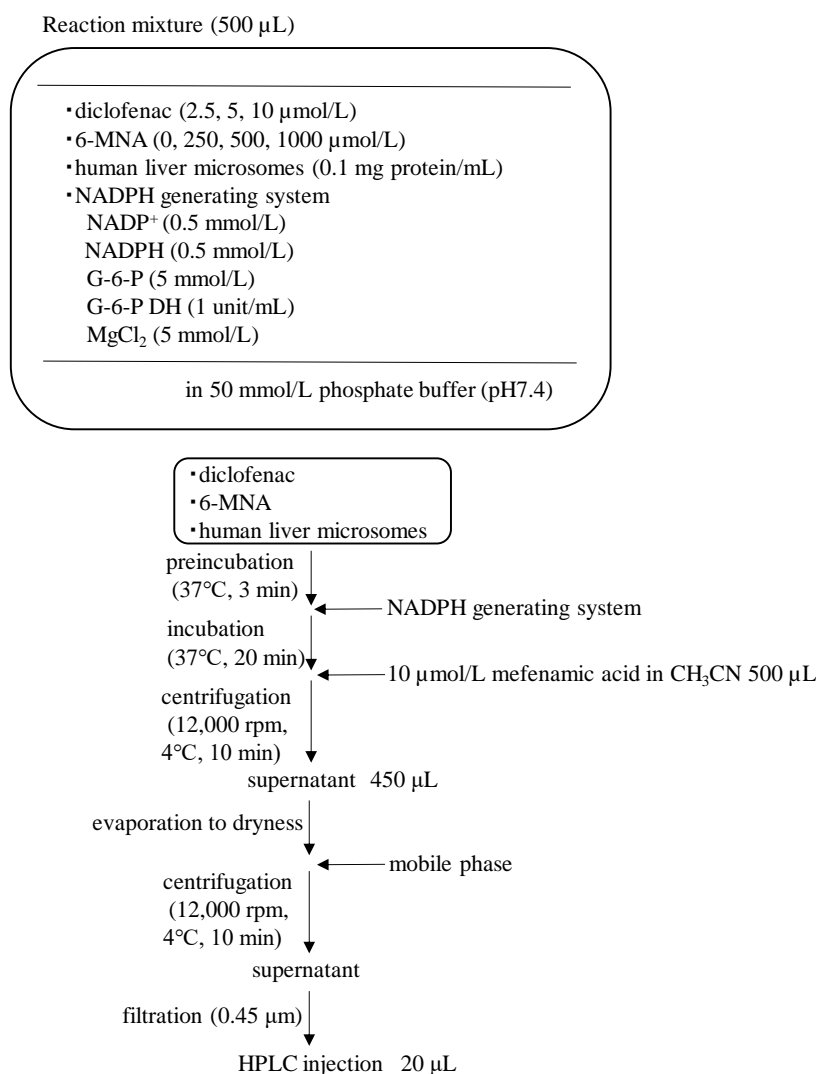
Scheme 14 Procedure for measurement of diclofenac 4'-hydroxylase activity.

Diclofenac の 4'-水酸化活性は、diclofenac (50 μ mol/L)、個別ヒト肝ミクロソーム (0.1 mg protein/mL)、NADPH 生成系 (0.5 mmol/L NADP, 0.5 mmol/L NADPH, 5 mmol/L G-6-P, 1 unit/mL G-6-P DH, 5 mmol/L MgCl₂) および 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.5 mL の反応液で測定した。上記の反応液は 37°C で 3 分間プレインキュベーションした後、NADPH 生成系の添加により反応を開始した。20 分間インキュベーションした後、内部標準物質である 10 μ mol/L mefenamic acid アセトニトリル溶液 500 μ L を添加して反応を停止した。反応液は 4°C で 12,000 rpm, 10 分間遠心分離し、得られた上清を試料とした。試料 450 μ L は遠心エバポレーターで蒸発乾固させ、残渣を HPLC の移動相溶媒に再溶解後、4°C で 12,000 rpm, 10 分間遠心分離し、得られた上清をメンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過し、HPLC で測定した (Scheme 14)。

決定係数 (r^2) は最小二乗法による線形回帰により求め、有意水準 5% の直線性の検定を行った (エクセル統計, エスミ, 東京)。

2-2-7 Diclofenac の 4'-水酸化活性に及ぼす 6-MNA の影響

CYP2C9 の特異的プローブ基質である diclofenac の 4'-水酸化活性に及ぼす 6-MNA の影響は、2-2-6 の手順に従い、diclofenac 濃度 2.5, 5 および 10 $\mu\text{mol/L}$ で代謝実験を行った。阻害剤である 6-MNA 濃度は 0, 250, 500 および 1000 $\mu\text{mol/L}$ とした (Scheme 15)。阻害の様式は、Lineweaver-Burk plot により推察し、 K_i 値は Dixon plot を用いて算出した。



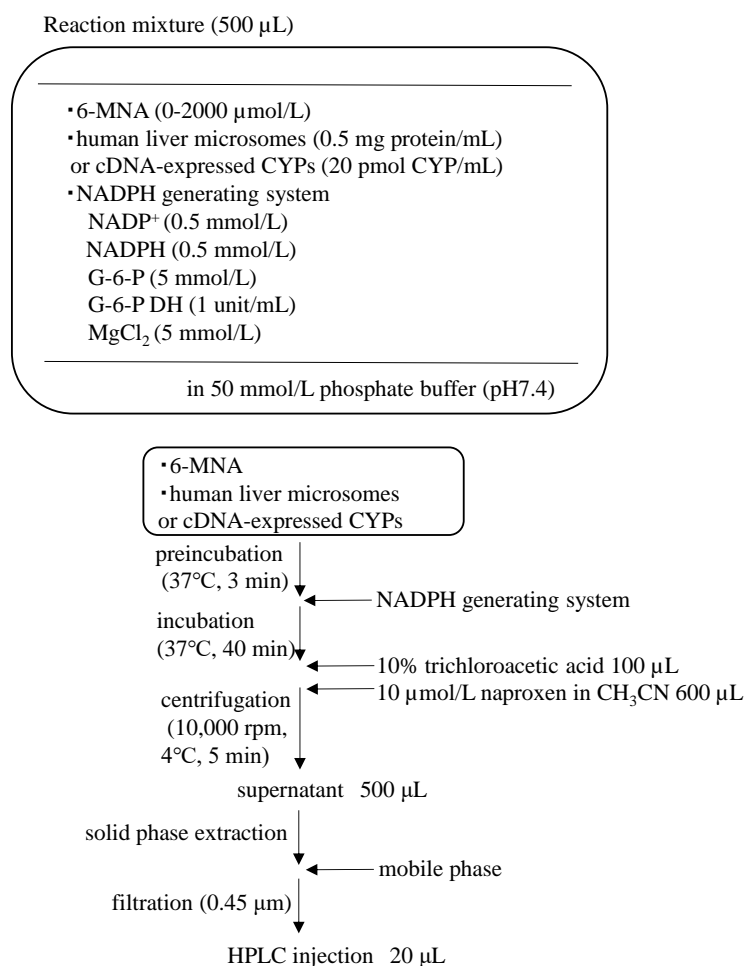
Scheme 15 Procedure of inhibition study of 6-MNA on 4'-hydroxylation of diclofenac.

2-2-8 ヒト CYP2C9 発現系マイクロソームと CYP2C9 の遺伝子型が決定されたヒト肝マイクロソームを用いた *in vitro* 代謝実験

CYP2C9 遺伝子の遺伝子型が決定された 7 人のヒト肝マイクロソームによる 6-MNA の代謝活性は、6-MNA (0, 50, 100, 200, 400, 1000, 2000 $\mu\text{mol/L}$)、個別ヒト肝マイクロソーム (0.5 mg protein/mL)、

NADPH 生成系 (0.5 mmol/L NADP⁺, 0.5 mmol/L NADPH, 5 mmol/L G-6-P, 1 unit/mL G-6-P DH, 5 mmol/L MgCl₂) および 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.5 mL の反応液で測定した. 上記の反応液は 37°C, 3 分間プレインキュベーションした後, NADPH 生成系の添加により反応を開始した. 37°C, 40 分間インキュベーションした後, 10%トリクロロ酢酸水溶液 100 μL および内部標準物質である 10 μmol/L naproxen アセトニトリル溶液 600 μL を添加して, 反応を停止した. 反応液は 4°Cで 10,000 rpm, 5 分間遠心分離し, 得られた上清を試料とした. ヒト CYP2C9 発現系ミクロソーム (CYP2C9.1, CYP2C9.2 および CYP2C9.3) による代謝実験では, 6-MNA 濃度を 0, 100, 200, 300, 400, 600, 1000 μmol/L, CYP 発現系ミクロソーム濃度を 20 pmol CYP/mL とした. 試料は 1-2-2 の方法と同様に前処理を行い, 生成した 6-HNA 量を HPLC で測定した (Scheme 16).

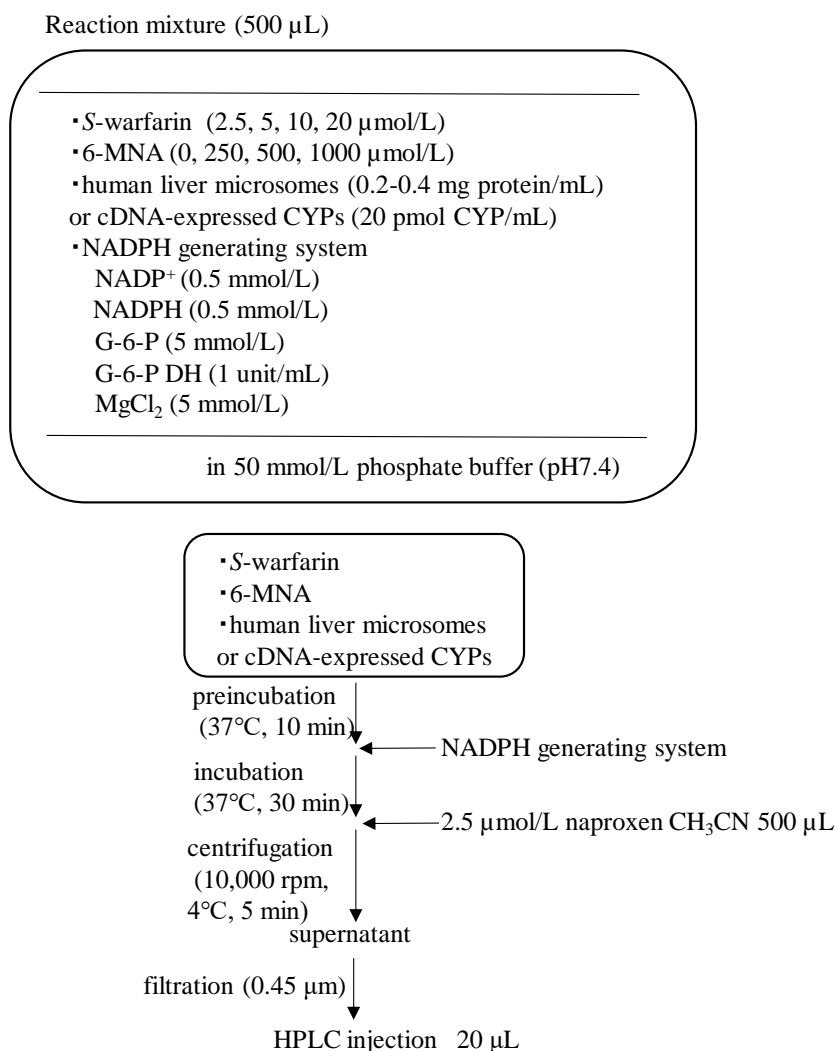
6-MNA から 6-HNA への酸化的代謝における K_m および V_{max} を, Eadie-Hofstee plot から最小二乗法にて直線回帰することにより算出した.



Scheme 16 Procedure of metabolism experiment of 6-MNA in human liver microsomes or cDNA-expressed CYPs.

2-2-9 S-Warfarin から 7-hydroxywarfarin への代謝活性の測定

S-Warfarin から 7-hydroxywarfarin の代謝活性は、Iwakawa らの方法 [54] を若干変更して測定した。S-warfarin (2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$)、個別ヒト肝ミクロソーム (0.2-0.4 mg protein/mL) またはヒト CYP 発現系ミクロソーム (20 pmol CYP/mL)、NADPH 生成系 (0.5 mmol/L NADP⁺, 0.5 mmol/L NADPH, 5 mmol/L G-6-P, 1 unit/mL G-6-P DH, 5 mmol/L MgCl₂) および 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.5 mL の反応液で測定した。上記の反応液は 37°C, 10 分間プレインキュベーションした後、NADPH 生成系の添加により反応を開始した。37°C, 30 分間インキュベーションした後、内部標準物質である 2.5 $\mu\text{mol/L}$ naproxen アセトニトリル溶液 500 μL を添加して、反応を停止した。反応液は 4°C で 10,000 rpm, 5 分間遠心分離し、得られた上清をメンブランフィルター (0.45 μm) でろ過し、生成した 7-hydroxywarfarin を HPLC で測定した (Scheme 17)。



Scheme 17 Procedure of inhibition study of 6-MNA on 7-hydroxylation of S-warfarin.

2-2-10 S-Warfarin から 7-hydroxywarfarin への生成における 6-MNA による阻害試験

S-Warfarin から 7-hydroxywarfarin への生成における 6-MNA の影響は、S-warfarin 濃度 2.5, 5 および 10 $\mu\text{mol/L}$, 阻害剤である 6-MNA 濃度 0, 250, 500 および 1000 $\mu\text{mol/L}$ で検討した。CYP2C9*3/*3 の個別ヒト肝マイクロソーム (HH519) を用いた場合のみ S-warfarin 濃度は、5, 10 および 20 $\mu\text{mol/L}$ とした (Scheme 17)。IC₅₀ 値は、y 軸に 6-MNA 非添加の時の 7-hydroxywarfarin の生成速度を 100% としたときの残存活性、x 軸に 6-MNA 濃度の log 値をプロットして、直線回帰することにより求めた [55]。Ki 値は Dixon plot を用いて算出した。

2-2-11 HPLC の定量条件

6-HNA の定量は、1-2-10 の方法に従って行った。移動相は 20 mmol/L リン酸水素二カリウム水溶液 (リン酸で pH 3.0 に調整) : アセトニトリル = 1 : 1 を用いた。遺伝子多型による影響の検討では、移動相は 20 mmol/L リン酸水素二カリウム水溶液 (リン酸で pH 3.0 に調整) : アセトニトリル = 3 : 2 を用いた。

4'-Hydroxydiclofenac は、Leemann らの方法 [56] を若干変更して定量した。HPLC 装置 (検出器は UV-Vis 検出器 (SPD-10Avp, 島津製作所) を用いた。) とカラムは 1-2-10 と同様のものを使用した。移動相は 100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) : アセトニトリル = 3 : 1 を用い、カラム温度は 50°C, 流速は 1.0 mL/min, 波長 282 nm に設定した。

7-Hydroxywarfarin は、Yamaori らの方法 [57] を若干変更して定量した。HPLC 装置は 1-2-10 と同じものを用いた。カラムは Mightysil RP-18 GP II (2.0×150mm, 5 μm ; 関東化学, 東京) を用い、グラジエント溶離で分離した。移動相のグラジエント条件は、A 液 : 0.04% (v/v) phosphoric acid, B 液 : アセトニトリルを 0-40 分は B 液の濃度を 20-40%, 40-50 分は B 液の濃度 40-20%, 50-60 分は B 液の濃度を 20% にして測定した。カラム温度は 40°C, 流速は 0.4 mL/min, 励起波長 320 nm, 蛍光波長 415 nm に設定した。

2-2-12 統計解析

阻害実験におけるコントロール (阻害剤非添加) との比較は、統計ソフト R (version 3.5.1) を用いて対応のない *t* 検定またはダネットの多重比較により評価した。いずれの場合も、有意水準は $p < 0.01$ とした。

CYP2C9 遺伝子型間の速度論パラメータの統計的有意性はウィリアムズの多重比較, CYP2C9 遺伝子型間の IC₅₀ および Ki 値の統計的有意性はダネットの多重比較により評価した (エクセル統計, エスミ)。

第3節 結果・考察

2-3-1 6-MNA から 6-hydroxy-2-naphthylacetic acid (6-HNA) への変換に関する検討

2-3-1-1 CYP 発現系ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝実験

ヒトおよびラット CYP 発現系ミクロソームを用いて、6-MNA から 6-HNA への変換に関与する CYP 分子種について検討した (Fig. 23)。ラット CYP 発現系ミクロソームでは、CYP1A2、CYP2C6 および CYP2C11 において 6-HNA の生成が認められた。ヒト CYP 発現系ミクロソームでは、検討した分子種の内 CYP2C9 のみが 6-MNA から 6-HNA への代謝活性を示した。

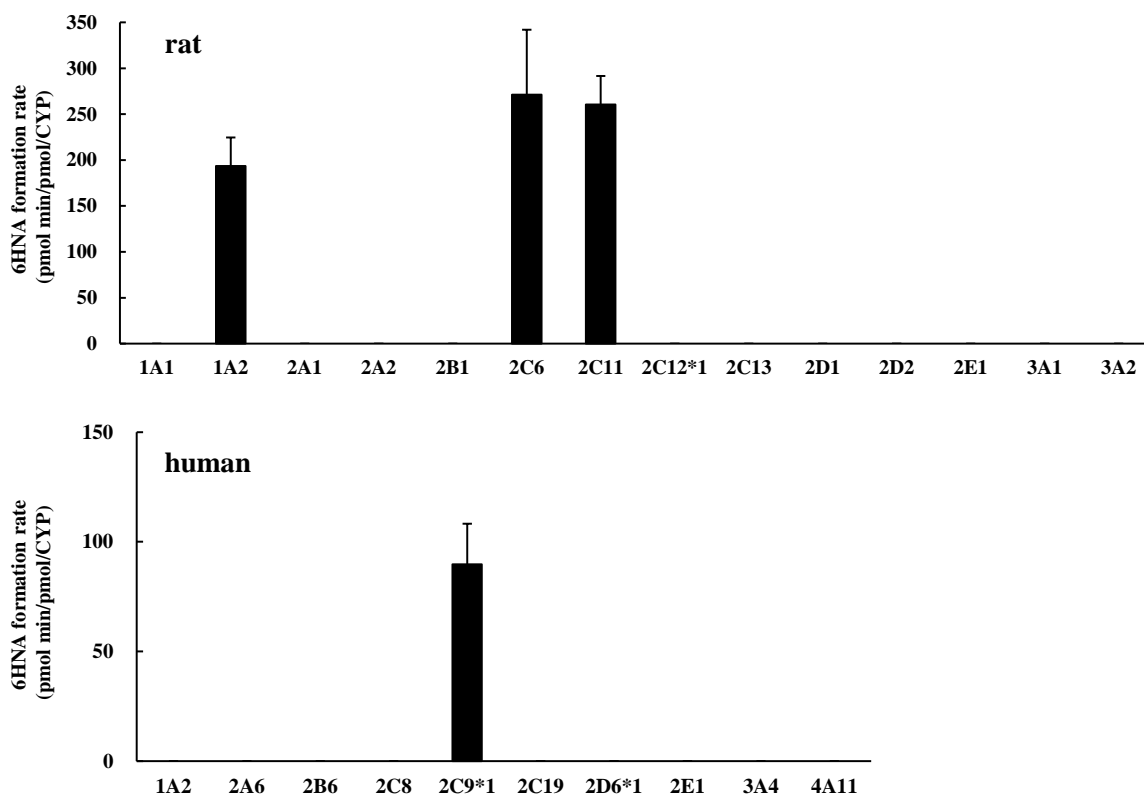


Fig. 23 Formation of 6-HNA from 6-MNA by cDNA-expressed CYPs.
Each bar represents the mean \pm S.D. (n=3).

2-3-1-2 酵素キネティックパラメータの算出

ヒトおよびラット肝ミクロソームを用いて、6-MNA から 6-HNA への 6-O-脱メチル化反応について Michaelis-Menten plot と Eadie-Hofstee plot を作成した (Fig. 24)。ヒトおよびラットいずれの

場合にも 6-HNA の生成速度は基質濃度の上昇に伴い飽和する傾向を示し、Michaelis-Menten 速度論に従った。Eadie-Hofstee plot はほぼ単相性を示し、最小二乗法により直線回帰して得られた直線の勾配および Y 軸との交点から K_m および V_{max} を求めた。また、 V_{max} を K_m で除することにより固有クリアランスを算出した。さらに、2-3-1-1 で 6-HNA の生成が観察されたヒト CYP2C9、ラット CYP1A2、CYP2C6 および CYP2C11 発現系マイクロソームを用いて同様に K_m 、 V_{max} および固有クリアランスを算出した。算出した酵素キネティックパラメータを Table 7 に示す。ラット CYP1A2 発現系マイクロソームでは、6-MNA 濃度 0-4000 μM の範囲において飽和が観察されなかったために、 K_m および V_{max} の値は得られなかった。

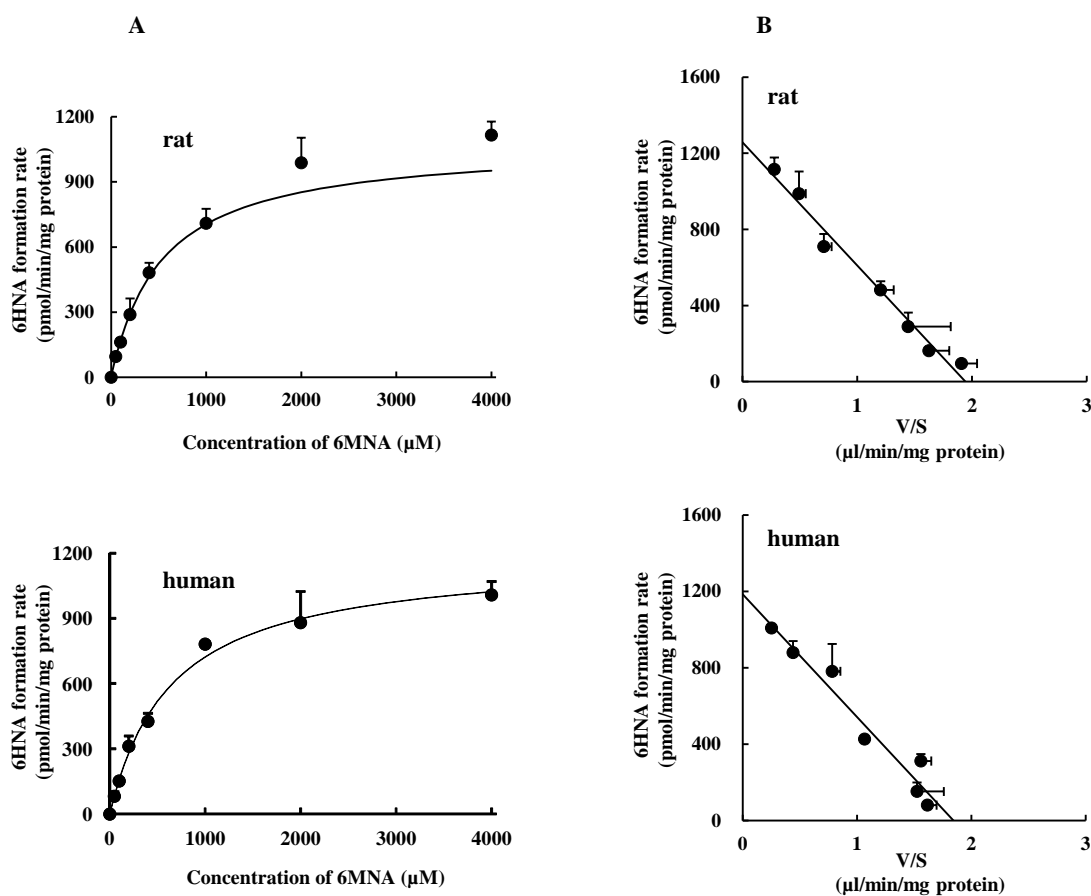


Fig. 24 Michaelis-Menten plots (A) and Eadie-Hofstee plots (B) for 6-HNA formation from pooled rat and human liver microsomes.

Each point represents the mean \pm S.D. (n=3).

Table 7 Kinetic analysis of the oxidation of 6-MNA by human and rat liver microsomes and cDNA expressed CYPs.

Enzyme source	K_m (mM)	V_{max} (nmol/min/mg protein)	V_{max}/K_m (μ l/min/mg protein)
Human liver Pooled	0.64 ± 0.03	1.17 ± 0.03	1.8 ± 0.0
CYP2C9*1	0.31 ± 0.04	4.77 ± 0.78	15.2 ± 0.9
Rat liver Pooled	0.72 ± 0.11	1.31 ± 0.07	1.8 ± 0.2
CYP2C6	0.33 ± 0.03	0.95 ± 0.10	2.9 ± 0.1
CYP2C11	0.14 ± 0.03	2.29 ± 0.21	16.6 ± 1.9

Data are the mean ± S.D. (n=3).

ヒト肝ミクロソームにおける 6-HNA 生成についての見かけの K_m 値 (0.64 mM) と V_{max} 値 (1.17 nmol/min/mg protein) は、ラット肝ミクロソームにおける K_m 値 (0.72 mM) と V_{max} 値 (1.31 nmol/min/mg protein) に類似しており、ヒトとラット間で V_{max}/K_m 値に著しい差は観察されなかった。ラット CYP 発現系ミクロソームを用いた代謝実験の結果から、6-HNA の生成には複数の CYP が関与する可能性が考えられたが、ラット肝ミクロソームの Eadie-Hofstee plot は単相性を示した。これは CYP2C6 と CYP2C11 の K_m 値が類似しているため、単相性を示したものと推察した [58-60]。ヒトおよびラット肝ミクロソームにおける K_m 値は、CYP 発現系ミクロソームにおける K_m 値より大きな値を示した。酵素の見かけの親和性が、肝臓ミクロソームと発現系ミクロソームで異なる結果となった理由は明確ではないが、肝臓ミクロソームと発現系ミクロソームでは NADPH-cytochrome P450 reductase 量、cytochrome-*b5* 量および脂質組成が同一ではないことなどが要因ではないかと考えられる [61-65]。

2-3-1-3 6-MNA の 6-O-脱メチル化代謝活性に対する化学阻害剤の影響

6-MNA から 6-HNA への 6-O-脱メチル化代謝に関与する酵素を推定するために、CYP および FMO の阻害剤 (Table 6) を用いた阻害実験の結果を示す (Fig. 25)。CYP 阻害剤である NBI と SKF525A は、ラットおよびヒト肝ミクロソームにおける 6-HNA の生成を阻害した。一方、FMO 阻害剤である thiourea と methimazole は、ヒト肝ミクロソームにおける 6-HNA の生成を阻害しなかった。ラット肝ミクロソームでは、methimazole により 6-HNA の生成が阻害されたが、methimazole と比較して FMO に対する選択性が高い thiourea [66, 67] で阻害の程度が小さかったことから、FMO の関与は低いと推察した。また、methimazole は FMO に対する阻害剤であるばかりでなく、複数の CYP 分子種の代謝依存性阻害剤であるとの報告があることから、ヒトとラットの代謝酵素の違いにより、methimazole の阻害の程度に差が生じたのではないかと考えた [68]。以上のことから、ラットおよびヒト肝ミクロソームにおける 6-MNA からの 6-HNA への 6-O-脱メチル化は、CYP が関与していることが示唆された。

Table 6 Inhibitors used in the inhibition studies. (p. 47 再掲)

Inhibitor	Concentration (mM)	Enzyme
<i>N</i> -Benzylimidazole (NBI)	1	CYP
SKF525A	0.12	CYP
Methimazole	1	FMO
Thiourea	1	FMO
Furafylline*	0.001	CYP1A2
Sulfaphenazole	0.02	CYP2C9
<i>S</i> -Mephenytoin	0.5	CYP2C19
Quinidine	0.005	CYP2D6
Diethyldithiocarbamate*	0.02	CYP2E1
Troleandomycin*	0.001	CYP3A4
Ketoconazole	0.001	CYP3A4
Cimetidine	0.25	CYP2C11/2C6

* : metabolism-dependent inhibitor

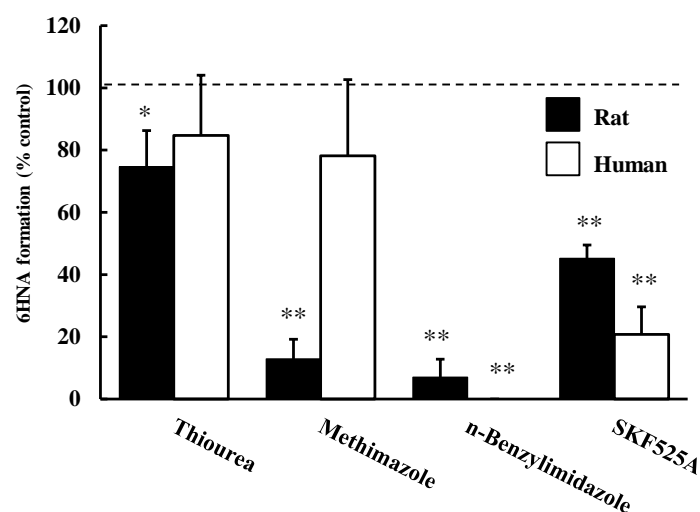


Fig. 25 Inhibition of 6-HNA formation from 6-MNA by co-incubation with FMO and CYP-inhibitors in human and rat liver microsomes.

Each bar represents the mean \pm S.D. (n=3). * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$, compared with no treatment of each inhibitor.

続いて、6-MNA の 6-HNA への 6-O-脱メチル化代謝に関与する CYP 分子種を詳細に同定するために、各 CYP 分子種の阻害剤を用いて検討を行った (Fig. 26). その結果、CYP2C9 の阻害剤である sulfaphenazole は、ヒト肝ミクロソームにおける 6-HNA の生成を 89.4%阻害したが、ラット肝ミクロソームでは阻害しなかった. Eagling らは CYP2C9 の特異的プローブ基質である tolbutamide の 4'-水酸化活性に対して、ラットでは sulfaphenazole の阻害効果は観られなかったことを報告している [69]. また、Bogaards らは CYP2C9 の特異的プローブ基質 diclofenac の 4'-水酸化活性に対しても、ラットにおいて sulfaphenazole は阻害効果を示さなかったことを報告している [70]. 今回の我々の検討でも、これらの報告と同様の結果となった. このことから、sulfaphenazole はヒト CYP2C9 を特異的に阻害することが示唆された. 一方, furafylline, S-mephenytoin, quinidine, diethyldithiocarbamate, troleandomycin および ketoconazole は、ヒト肝ミクロソームにおける 6-HNA の生成を阻害しなかった. また、ラット肝ミクロソームでは 6-HNA の生成を顕著に阻害するものは無かった.

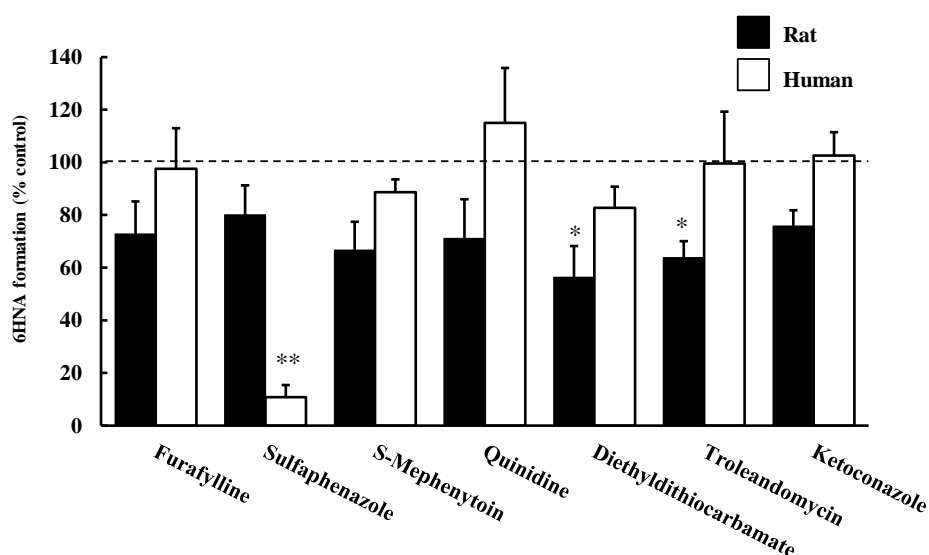


Fig. 26 Inhibition of 6-HNA formation from 6-MNA by co-incubation with CYP-inhibitors in human and rat liver microsomes.

Each bar represents the mean \pm S.D. (n=3). * p < 0.01, ** p < 0.001, compared with no treatment of each inhibitor.

ラット肝ミクロソームにおける 6-MNA から 6-HNA への 6-O-脱メチル化代謝に対する CYP2C6 および CYP2C11 の関与の可能性を検討するため、CYP2C11 と CYP2C6 の阻害剤である cimetidine を用いて雄および雌のラット肝ミクロソームでの代謝実験を行った (Fig. 27). Cimetidine は 6-HNA の生成を雄および雌のラット肝ミクロソームにおいてそれぞれ約 70%および 40%減少させた. Cimetidine による阻害効果は雌よりも雄ラット肝ミクロソームの方が約 1.5 倍大きかった.

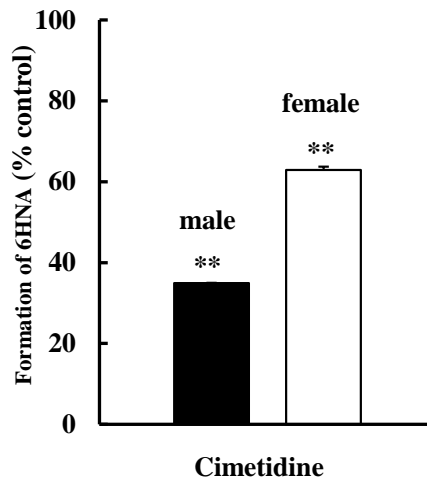


Fig. 27 The effects of cimetidine on the 6-HNA formation from 6-MNA in male and female rat liver microsomes.

Each bar represents the mean \pm S.D. (n=3). * p < 0.001, compared with no treatment of each inhibitor.

2-3-1-4 6-MNA の 6-O-脱メチル化代謝活性に対する阻害抗体の影響

6-MNA から 6-HNA への 6-O-脱メチル化代謝活性に対する阻害抗体の影響について検討した (Fig. 28). ラットおよびヒト肝ミクロソームでは, ラット NADPH-P450 reductase 抗体により 6-HNA の生成が約 80%減少した. ラット肝ミクロソームにおける 6-HNA の生成は, ラット CYP2C11 抗体で約 75%阻害されたが, ラット CYP1A2 抗体はほとんど阻害効果を示さなかった. 一方, ヒト CYP2C9 抗体は, ヒト肝ミクロソームにおける 6-HNA の生成を約 80%阻害した.

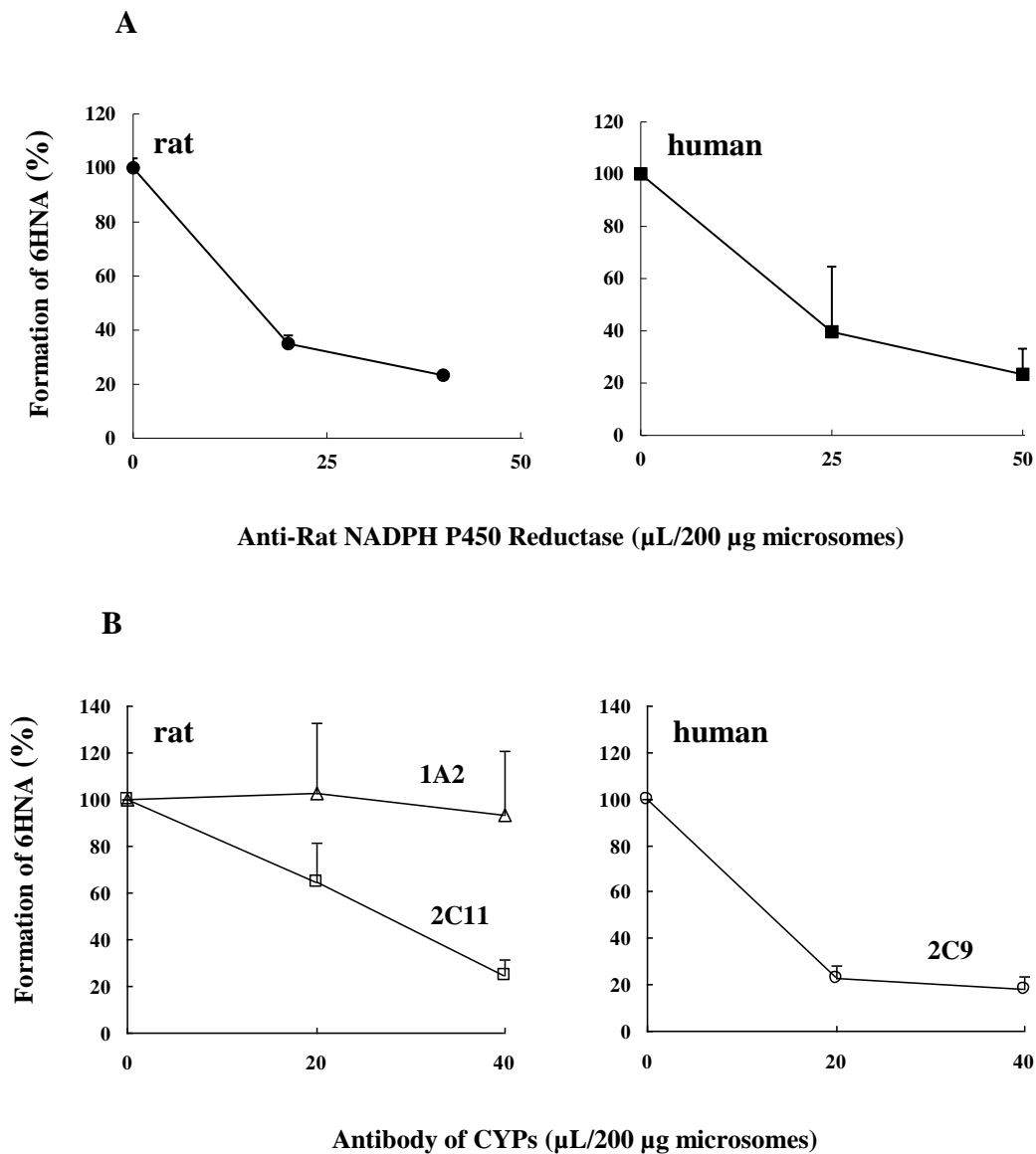


Fig. 28 The effects of anti-rat NADPH P450 reductase antibody (A) and antibody of CYPs (B) on the 6-HNA formation from 6-MNA in human and male rat liver microsomes.

Each point represents the mean \pm S.D. (n=3).

雄および雌ラット肝ミクロソームにおける、6-MNA から 6-HNA への 6-O-脱メチル化代謝活性に対するラット CYP2C11 阻害抗体による影響を検討した結果を Fig. 29 に示す。雄および雌ラット肝ミクロソームで、6-HNA の生成は CYP2C11 抗体の添加により約 80%阻害された。ラットでは CYP2C の発現に性差があり、CYP2C11 は雄性ラットに発現しているが、雌性ラットには発現していない。一方、CYP2C6 の発現には性差がないことが知られている [71-73]。ラット CYP2C11 抗体は CYP2C6 と交差反応性を示す [74] ことから、CYP2C11 を含有しない雌ラット肝ミクロソームにおいて、ラット CYP2C11 抗体により 6-HNA の生成が阻害されたのは、CYP2C6 に対する阻害効果によるものと推察した。

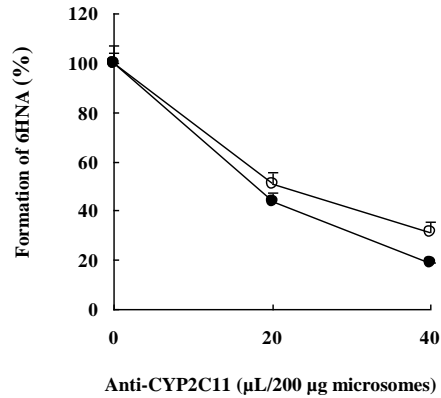


Fig. 29 The effects of anti-CYP2C11 antibody on the 6-HNA formation from 6-MNA in male (●) and female (○) rat liver microsomes.
Each point represents the mean \pm S.D. (n=3).

2-3-1-5 6-MNA から 6-HNA 代謝における代謝活性化剤 dapsone の影響

合成抗菌薬の一つである dapsone は CYP2C9 の基質薬物の代謝を活性化させることが報告されている [53]. ヒト肝マイクロソームおよびラット肝マイクロソームを用いて, 6-MNA からの 6-HNA の生成に対する dapsone の影響について検討した (Fig. 30). ヒト肝マイクロソームでは dapsone の添加により 6-HNA 生成は促進され, コントロールの約 4 倍となったが, ラット肝マイクロソームでは促進されなかった. 本章のこれまでの結果から, ヒト肝マイクロソームでは主に CYP2C9 が 6-MNA から 6-HNA への 6-O-脱メチル化代謝を触媒することが示唆されている. これらのことから, dapsone はヒト CYP2C9 に特異的に働くことが推察された.

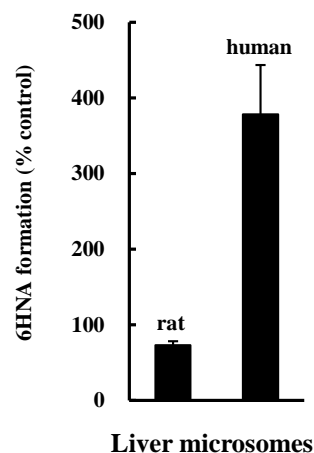


Fig. 30 The effects of dapsone on the 6-HNA formation from 6-MNA in human and rat liver microsomes.
Each bar represents the mean \pm S.D. (n=3).

2-3-1-6 6-MNA の 6-O-脱メチル化代謝活性と diclofenac の 4'-水酸化活性の相関性の検討

6-MNA から 6-HNA への 6-O-脱メチル化代謝活性と CYP2C9 の特異的プローブ基質である diclofenac の 4'-水酸化活性の相関性を、個別ヒト肝ミクロソーム (HG3, HG74, HG95, HH13, HH47, HK37) を用いて検討した (Fig. 31). 6 人のドナーとサンプルサイズが小さいにもかかわらず, diclofenac の 4'-水酸化活性と 6-MNA の 6-O-脱メチル化代謝活性との間に有意な相関関係 ($r^2=0.95$, $p<0.001$) が観察された.

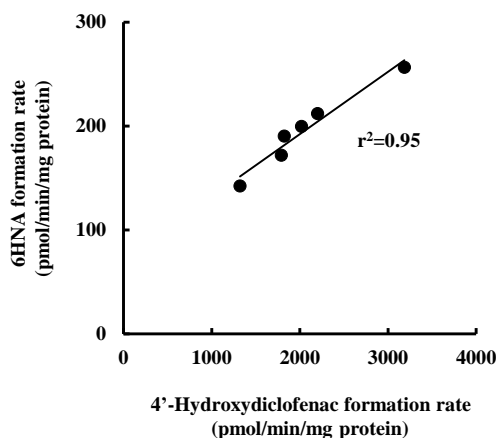


Fig. 31 Correlation between the diclofenac 4'-hydroxylation activity (CYP2C9) and 6-HNA formation rate in six human liver microsomal samples.

2-3-1-7 Diclofenac の 4'-水酸化活性に及ぼす 6-MNA の影響

CYP2C9 の特異的プローブ基質である diclofenac の 4'-水酸化活性に及ぼす 6-MNA の影響について検討した. Diclofenac は濃度を 2.5, 5 および 10 $\mu\text{mol/L}$, 6-MNA は濃度を 0, 250, 500 および 1000 $\mu\text{mol/L}$ で阻害試験を行った (Fig. 32). 3つの 6-MNA 濃度 (250, 500 および 1000 $\mu\text{mol/L}$) で, 6-MNA 非添加時と比べて diclofenac 4'-水酸化の V_{max} が減少したが, K_m はそれぞれ 6-MNA 非添加時の 4.35 μM から 5.43, 5.44 および 8.47 μM に増加したことから, 6-MNA が diclofenac の 4'-水酸化活性に対する混合型阻害剤であることが示唆された. Dixon plot より, diclofenac の 4'-水酸化活性に対する 6-MNA の K_i 値は 724.2 μM であった.

Nabumetone の反復経口投与 (800 mg/day) 時の定常状態における 6-MNA の血清非結合薬物濃度は約 2 μM である [16]. この値は今回得られた K_i 値の約 1/400 倍低いいため, 6-MNA が CYP2C9 によって代謝される他の薬物のクリアランスを大きく変化させることはないと推察した.

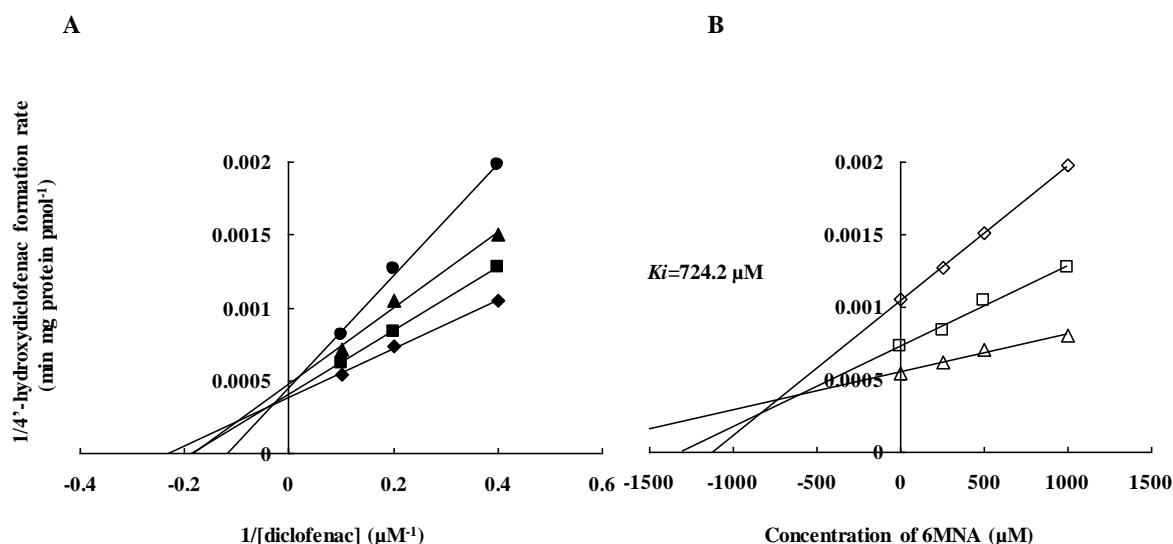


Fig. 32 Lineweaver-Burk plots at 0 μM (◆), 250 μM (■), 500 μM (▲) and 1000 μM (●) concentrations of 6MNA (A) and Dixon plots at 2.5 μM (◇), 5 μM (□) and 10 μM (△) concentrations of diclofenac (B).

Each point represents the mean ($n=3-4$).

2-3-2 6-MNA から 6-HNA への変換における遺伝子多型の影響に関する検討

2-3-2-1 ヒト CYP2C9 発現系ミクロソームと CYP2C9 の遺伝子型が決定されたヒト肝ミクロソームを用いた 6-MNA から 6-HNA の変換における酵素キネティックパラメータの算出

CYP2C9 は, phenytoin, tolbutamide, torsemide, *S*-warfarin や多数の NSAIDs など, 多くの臨床的に重要な薬物の代謝に寄与する酵素である [75-79]. CYP2C9 には遺伝子多型が存在し, その発現頻度は人種によって異なることも知られている. 代表的なものとして CYP2C9*1 (野生型) に対して, *2(Arg144Cys)と*3 (Ile359Leu)が知られている. 日本人における発現頻度は CYP2C9*1 が約 98%, *2 が 0%, *3 が約 2%である. また, CYP2C9 の変異型アレルのうち, 日本人に代謝活性低下が臨床的に影響を及ぼすことが知られているのは CYP2C9*3 である. そのうち, CYP2C9*3 へテロ接合体は約 50 人に 1 人, ホモ接合体は約 2500 人に 1 人の発現頻度と推定される [80].

前項の結果から, ヒトにおける 6-MNA から 6-HNA への変換は CYP2C9 が関与していることが明らかになった. そこで, 6-MNA から 6-HNA への変換における遺伝子多型の影響について検討した.

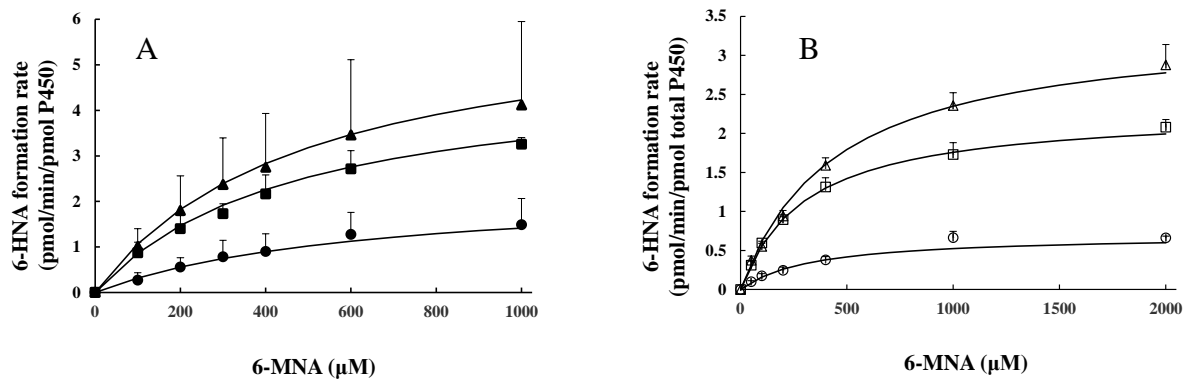


Fig. 33 Michaelis-Menten plots for 6-*O*-demethylation of 6-MNA by cDNA-expressed CYP2C9.1 (▲), CYP2C9.2 (■) and CYP2C9.3 (●) (A), and human liver microsomes from three subjects with homologous alleles (B), HG95: △ , genotypes *CYP2C9**1/*1, HH809: □ , genotypes *CYP2C9**2/*2, HH519:○, genotypes *CYP2C9**3/*3. Error bars represent the mean ± S.D. (n=3).

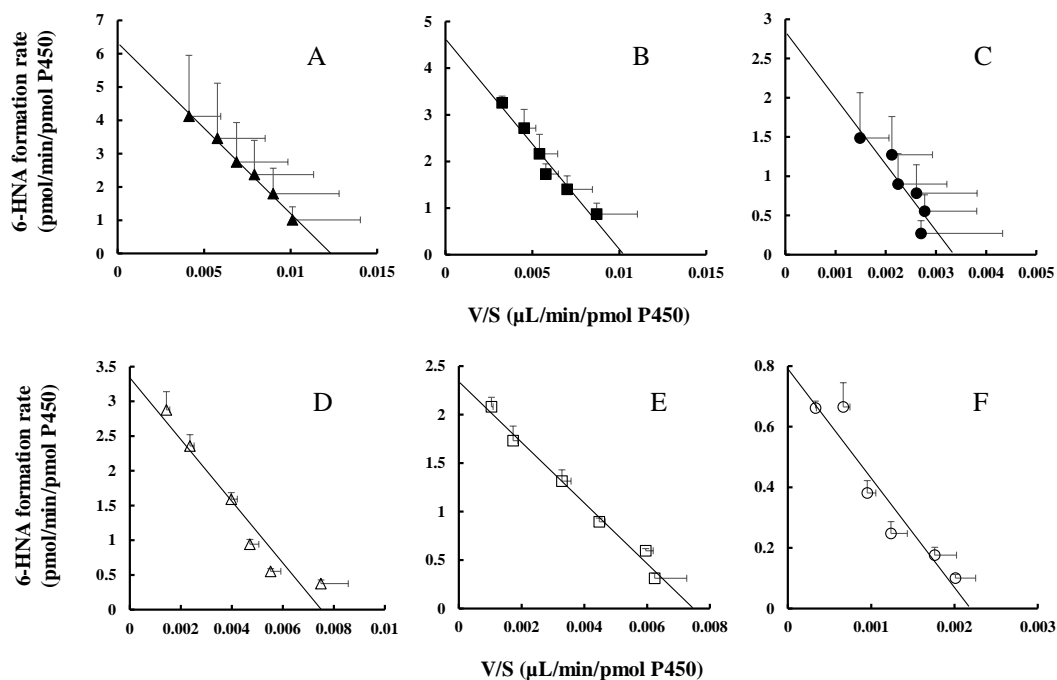


Fig. 34 Eadie-Hofstee plots for 6-*O*-demethylation of 6-MNA by cDNA-expressed CYP2C9.1 (A), CYP2C9.2 (B) and CYP2C9.3 (C), and human liver microsomes from three subjects with homologous alleles (genotypes *CYP2C9**1/*1, HG95:D, *CYP2C9**2/*2, HH809:E, *CYP2C9**3/*3, HH519: F). Error bars represent the mean ± S.D. (n=3).

CYP 発現系マイクロソーム (CYP2C9.1, CYP2C9.2, CYP2C9.3) および 7 人のヒト個別肝マイクロソーム [CYP2C9*1/*1 (HH47, HG95, HH18), CYP2C9*1/*2 (HG74), CYP2C9*1/*3 (HG3), CYP2C9*2/*2 (HH809), CYP2C9*3/*3 (HH519)] を用いて, 6-MNA から 6-HNA の変換における酵素キネティックパラメータを算出した. CYP 発現系マイクロソームおよびヒト個別肝マイクロソーム (野生型, Cys144 (*2) および Leu359 (*3) ホモ接合体) を用いたときの Michaelis-Menten plot と Eadie-Hofstee plot を Fig. 33 と Fig. 34 に示す. いずれの場合にも 6-HNA の生成速度は基質濃度の上昇に伴い飽和する傾向を示し, Michaelis-Menten 速度論に従った. また, Eadie-Hofstee plot はほぼ単相性を示し, 線形最小二乗法により得られた直線の勾配および Y 軸との交点から K_m および V_{max} を求めた. さらに V_{max} を K_m 除することにより固有クリアランスを求めた. Table 8 には, 上記で得られた結果と CYP2C9*1/*2 (HG74), CYP2C9*1/*3 (HG3) の結果を併せて示す.

Table 8 Kinetic parameters for 6-HNA formation from 6-MNA in cDNA-expressed CYP2C9 and in human liver microsomes.

	V_{max} (pmol/min/Total pmol CYP)	K_m (μM)	V_{max}/K_m (nL/min/Total pmol CYP)	ratio ^{**,***}
cDNA-expressed CYP2C9				
CYP2C9.1	6.3±3.3	489.8±95.0	12.4±4.7	3.3
CYP2C9.2	4.9±2.0	466.5±177.0	11.7±6.8	3.1
CYP2C9.3	2.3±0.8*	624.6±139.2	3.8±1.8*	1
Human liver microsomes				
HH47 (*1/*1)	3.6±0.7	407.0±145.6	9.2±2.2	4.0
HG95 (*1/*1)	3.4±0.4	448.3±127.2	7.8±1.2	3.4
HH18 (*1/*1)	5.3±0.3	396.3±53.5	13.4±1.1	5.8
HG74 (*1/*2)	3.3±0.3	318.6±52.7	10.0±1.4	4.3
HG3 (*1/*3)	3.5±0.1	306.5±52.1	11.6±1.7	5.0
HH809 (*2/*2)	2.3±0.1	308.4±41.1	7.6±0.8	3.3
HH519 (*3/*3)	0.7±0.1	338.1±57.0	2.3±0.2	1

Results are expressed as mean ± S.D. (n=3).

* $p < 0.05$ vs. CYP2C9.1

**Data are expressed as the ratio of the V_{max}/K_m value in each recombinant divided by the V_{max}/K_m value in CYP2C9.3.

***Data are expressed as the ratio of the V_{max}/K_m value in each microsome divided by the V_{max}/K_m value in CYP2C9*3/*3.

発現系マイクロソームを用いた実験では, Leu359 変異型は野生型よりもわずかに高い K_m 値を示した. また, Leu359 変異型の V_{max} と V_{max}/K_m は野生型と比べてどちらも約 1/3 と有意に低い値を示した. これらの結果は, Iida らの lornoxicam 5'-hydroxylation に対する Leu359 変異型の影響についての結果と類似していた [76]. これらのことから, Leu359 変異型は 6-MNA の酵素への親和性だけでなく, 代謝能力にも影響を及ぼす可能性が示唆された. 一方, 野生型と Cys144 変異型との間の K_m , V_{max} および V_{max}/K_m は同等の値であった. これらの結果は, Sullivan-Klose らの tolbutamide および S-warfarin の報告 [77], Miners らの torsemide の報告 [78] と類似していた. 一方, Rettie らは Cys144 変異型では野生型に比べて S-warfarin の V_{max} および V_{max}/K_m が低下したと報告している [79]. Crespi と Miller は, 野生型と Cys144 変異型との間の S-warfarin に対する V_{max} の差は, 使用する発現系マイクロソームに依存し, CYP に対する NADPH-P450 oxidoreductase の比によって影響されることを報告している [81]. したがって, ヒト肝臓マイクロソームにおける 6-MNA から 6-HNA の変換に対する Cys144 変異型の影響を明らかにするためには, CYP2C9*2/*2 と遺伝子型

が決定されたヒト肝臓試料を使用することが必要であると考えた。

遺伝子型が決定されたヒト個別マイクロソームを用いた代謝実験では、3人の野生型のマイクロソームの V_{max} 値はそれぞれ 3.6, 3.4 および 5.3 pmol/min/pmol total P450 であった。Cys144 ヘテロ接合体と Leu359 ヘテロ接合体では、 V_{max} は 3.3 および 3.5 pmol/min/pmol total P450 であり、野生型と類似していた。Leu359 ホモ接合体では、 V_{max} は 0.7 pmol/min/pmol total P450 であり、他の個別マイクロソームに比べて低い値であった。一方、 K_m 値は7人の個別マイクロソーム間で同等な値であった。Leu359 ホモ接合体では、他の個別マイクロソームに比べて 3-6 倍低い V_{max}/K_m 値を示した。Leu359 ホモ接合体が他の個別マイクロソームに比べて低い値を示したのは、 V_{max} の変化による影響が大きいと考えられる。Cys144 ホモ接合体は比較的低い V_{max} 値を示したが、 V_{max}/K_m 値は、野生型や Cys144 ヘテロ接合体、Leu359 ヘテロ接合体と同等な値であった。Leu359 ホモ接合体のマイクロソームでは 6-MNA の O-脱メチル化活性は非常に低く、6-MNA から 6-HNA への代謝クリアランスが低下する可能性が示唆された。一方、Cys144 ホモ接合体、Cys144 ヘテロ接合体および Leu359 ヘテロ接合体では、野生型に比べて V_{max}/K_m 値が同様な値であった。6-MNA の血漿タンパク結合率 99.75-99.91% [16]、ヒト肝血流量 (Q_h) 0.95 mL/min/g liver、ヒト肝臓中のマイクロソームタンパク質含量 52.5 mg protein/g liver [82] および今回得られた野生型の V_{max}/K_m 値を用いて 6-MNA の肝抽出率を推定すると、6-MNA は低抽出率薬物に分類される。低抽出率薬物は、肝固有クリアランスのわずかな変化が薬物の肝代謝クリアランスに影響を与えることが考えられる。このことから、Leu359 ホモ接合体の低い肝固有クリアランスは、*in vivo* での 6-MNA の肝代謝クリアランスに影響を与える可能性が示唆された。

2-3-2-2 S-Warfarin から 7-hydroxywarfarin 生成に対する 6-MNA による阻害試験

S-Warfarin の 7-hydroxywarfarin への生成に対する 6-MNA の阻害効果について、発現系ヒト CYP2C9 ミクロソーム (CYP2C9.1, CYP2C9.2, CYP2C9.3) およびヒト個別肝マイクロソーム [CYP2C9*1/*1 (H0465), CYP2C9*2/*2 (HH809-1), CYP2C9*3/*3 (HH519)] を用いて検討を行った結果を Table 9 と 10 に示す。

Table 9 IC₅₀ of 6-MNA on *S*-warfarin 7-hydroxylation by cDNA-expressed CYP2C9 and human liver microsomes.

	IC ₅₀ (μM)
cDNA-expressed CYP2C9	
CYP2C9.1	416.6±10.5
CYP2C9.2	533.7±34.1*
CYP2C9.3	432.6±31.2
Human liver microsomes	
H0465 (*1/*1)	472.2±31.6
HH809-1 (*2/*2)	399.2±2.2
HH519 (*3/*3)	597.9±93.7*

Results are expressed as mean ± S.D. (n=3).
**p*<0.05 vs. CYP2C9.1 or CYP2C9*1/*1

Table 10 *Ki* of 6-MNA on *S*-warfarin 7-hydroxylation by cDNA-expressed CYP2C9 and human liver microsomes.

	<i>Ki</i> (μM)
cDNA-expressed CYP2C9	
CYP2C9.1	167.6±37.9
CYP2C9.2	156.5±10.2
CYP2C9.3	270.8±46.1
Human liver microsomes	
H0465 (*1/*1)	137.8±30.5
HH809-1 (*2/*2)	69.2±14.1
HH519 (*3/*3)	300.1±115.2*

Results are expressed as mean ± S.D. (n=3).
**p*<0.05 vs. CYP2C9.1 or CYP2C9*1/*1

6-MNA は、濃度依存的に CYP2C9.1, CYP2C9.2 および CYP2C9.3 の *S*-warfarin の 7-水酸化活性を阻害した。CYP2C9.1, CYP2C9.2 および CYP2C9.3 の IC₅₀ 値はそれぞれ 416.6, 533.7 および 432.6 μM であり、野生型と Leu359 変異型ではほぼ同等な値であった。ヒト個別肝ミクロソーム（野生型, Cys144 および Leu359 ホモ接合体）を用いて行った阻害試験では、野生型に比べて Leu359 ホモ接合体の IC₅₀ 値は大きな値を示した。

S-Warfarin の 7-水酸化活性に対する 6-MNA の阻害効果について、Dixon plot より阻害定数 (*Ki* 値) を算出し、阻害形式を推定した。6-MNA による阻害形式は、発現系ヒト CYP2C9 ミクロソームとヒト個別肝ミクロソームの全てにおいて混合阻害を示した。CYP2C9.3 による *S*-warfarin の 7-水酸化における 6-MNA の見かけの *Ki* 値は、CYP2C9.1 によるものよりも高かった。ヒト個別ミクロソームを用いた阻害実験では、Leu359 ホモ接合体における見かけの *Ki* 値もまた、野生型よりも高い値を示した。Cys144 ホモ接合体における 6-MNA の見かけの *Ki* 値は、他のものよりも低い値を有する傾向を示した。

6-MNA は、野生型だけでなく Cys144 ホモ接合体 (*2/*2) および Leu359 ホモ接合体 (*3/*3) での *S*-warfarin の 7-水酸化活性に対して阻害効果を示すことが明らかとなった。また、6-MNA による阻害効果は CYP2C9 遺伝子型間で多少異なっており、野生型に比べて Leu359 ホモ接合体では小さいことが示唆された。

第4節 小括

ヒト CYP 発現系ミクロソームを用いて 6-MNA の不活化代謝について検討したところ、CYP2C9 発現系ミクロソームでは 6-HNA の生成が認められたが、他の CYP 発現系ミクロソームでは生成が観られなかった。また、各 CYP 分子種の化学的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 の代謝に関与する CYP 分子種は CYP2C9 であることが明らかとなった。

一方、ラット CYP 発現系ミクロソームによる 6-MNA の不活化代謝の検討では、CYP1A2、CYP2C6 および CYP2C11 発現系ミクロソームで 6-HNA の生成が観察された。ラット CYP1A2 発現系ミクロソームで 6-HNA の生成が観察された。雄ラットの CYP2C11 含有量は全 CYP の 54% を占めるが、CYP1A2 は 2% と低く [71-73]、阻害抗体による阻害実験の結果を合わせて考えると、CYP1A2 が 6-MNA 代謝に関わる酵素分子種とは考えにくい。さらに、各 CYP 分子種の化学的阻害剤および阻害抗体による阻害実験を行ったところ、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 であることが明らかとなった。

6-MNA の不活化代謝について、ヒトとラットの肝ミクロソームを用いて種差を比較したところ、ヒト肝ミクロソームにおける 6-HNA 生成の見かけの K_m 値と V_{max} 値はラット肝ミクロソームの値と類似しており、ヒトとラットの間で V_{max}/K_m 値に著しい差は観察されなかった。

6-MNA から 6-HNA への遺伝子多型の影響を検討するために、野生型と変異型の CYP2C9 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。CYP 発現系ミクロソームを用いた代謝実験では、Leu359 変異型の 6-MNA の 6-O-脱メチル化の固有クリアランスは、野生型に比べて有意に低かったが、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。

6-MNA の代謝阻害に関する特性を明らかにするため、野生型と変異型の CYP2C9 発現系ミクロソームおよび遺伝子型が決定された個別ミクロソームを用いて *S-warfarin* 代謝に対する阻害試験を行った。6-MNA は、野生型だけでなく Cys144 ホモ接合体および Leu359 ホモ接合体における *S-warfarin* の 7-水酸化活性に対しても阻害効果を示した。6-MNA による阻害効果は CYP2C9 遺伝子型間で多少異なっており、Leu359 ホモ接合体では野生型に比べて 6-MNA の阻害を受けにくいことが示唆された。今回の *in vitro* 阻害実験では、6-MNA の *S-warfarin* の 7-水酸化に対する阻害効果が観察された。しかし、nabumetone をヒトに常用量で投与した場合の 6-MNA の定常状態血清非結合薬物濃度は約 2 μM であることから、nabumetone と *S-warfarin* の併用が臨床上問題になるとは考えにくいことが判明した。

CYP2C9 の変異型アレルのうち日本人において臨床的意義が明かされているのは Leu359 アレルである。ホモ型の Leu359 変異により 6-MNA のクリアランス低下が推察されたが、ヘテロ型の Leu359 変異では、6-MNA のクリアランスは野生型と変わらないことが示唆された。しかし、日本人のホモ型 Leu359 アレルの出現頻度は極めて稀であることから、臨床上的問題はないと推察した。6-MNA から 6-HNA の不活性化クリアランスに CYP2C9 の遺伝子多型が臨床的にどの程度影響するかについては、さらに検討が必要と考える。

第3章 Nabumetone の非活性化代謝に関する検討

第1節 緒言

Nabumetone には、6-MNA に活性化される経路以外に、活性化されない代謝経路、すなわち非活性化代謝経路が存在する。非活性化代謝経路は2つあり、ひとつは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) となる経路、もうひとつは6-methoxy 基が脱メチル化されて4-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)butan-2-one (M3) になる経路である (Fig. 35) [18].

Skarydova らはヒト肝サイトゾル中に存在する8種のカルボニル還元代謝酵素 (carbonyl reductase 1, 3 (CBR1, 3), aldo-keto reductase 1B1 (AKR1B1), AKR1B10, AKR1C1, 2, 3, 4) の発現系サイトゾルを用いて、nabumetone の *in vitro* 代謝実験を行った。その結果、CBR3 以外のカルボニル還元代謝酵素は、nabumetone から MNBO への還元活性を有していたことを報告している [83]。しかし、nabumetone から MNBO への変換に関与する酵素分子種の詳細は十分にわかっていない。

第3章では、はじめに nabumetone から MNBO への還元代謝に関与する酵素を推定するために、以下の3つの *in vitro* 代謝実験を行った。

- 1) ヒト肝ミクロソームおよびサイトゾルを用いて nabumetone から MNBO への還元反応の速度論的解析を行い、酵素キネティックパラメータを算出した。
- 2) 数種の還元代謝に関わる酵素の化学阻害剤を用いてヒト肝ミクロソームおよびサイトゾルでの nabumetone から MNBO への還元反応に対する阻害剤の影響を評価した。
- 3) ヒト個別ミクロソームおよびサイトゾルを用いて nabumetone と還元代謝酵素により代謝を受けることが報告されている数種の基質の反応速度の相関性を評価した。

次に、nabumetone の6-methoxy 基が脱メチル化されて M3 になる経路について、以下の4つの *in vitro* 代謝実験を行った。

- 1) ヒト CYP 発現系ミクロソームを用いて nabumetone から M3 への6-O-脱メチル化を触媒する酵素分子種を推定した。
- 2) ヒト肝ミクロソームを用いて nabumetone から M3 への6-O-脱メチル化の速度論的解析を行い、酵素キネティックパラメータを算出した。
- 3) 数種の CYP 阻害剤および CYP 抗体を用いて、ヒト肝ミクロソームにおける nabumetone の6-O-脱メチル化に対する阻害剤および阻害抗体の影響を評価した。
- 4) Silensomes™を用いて、nabumetone の O-脱メチル化反応に関与する各 CYP 分子種の寄与率を算出した。

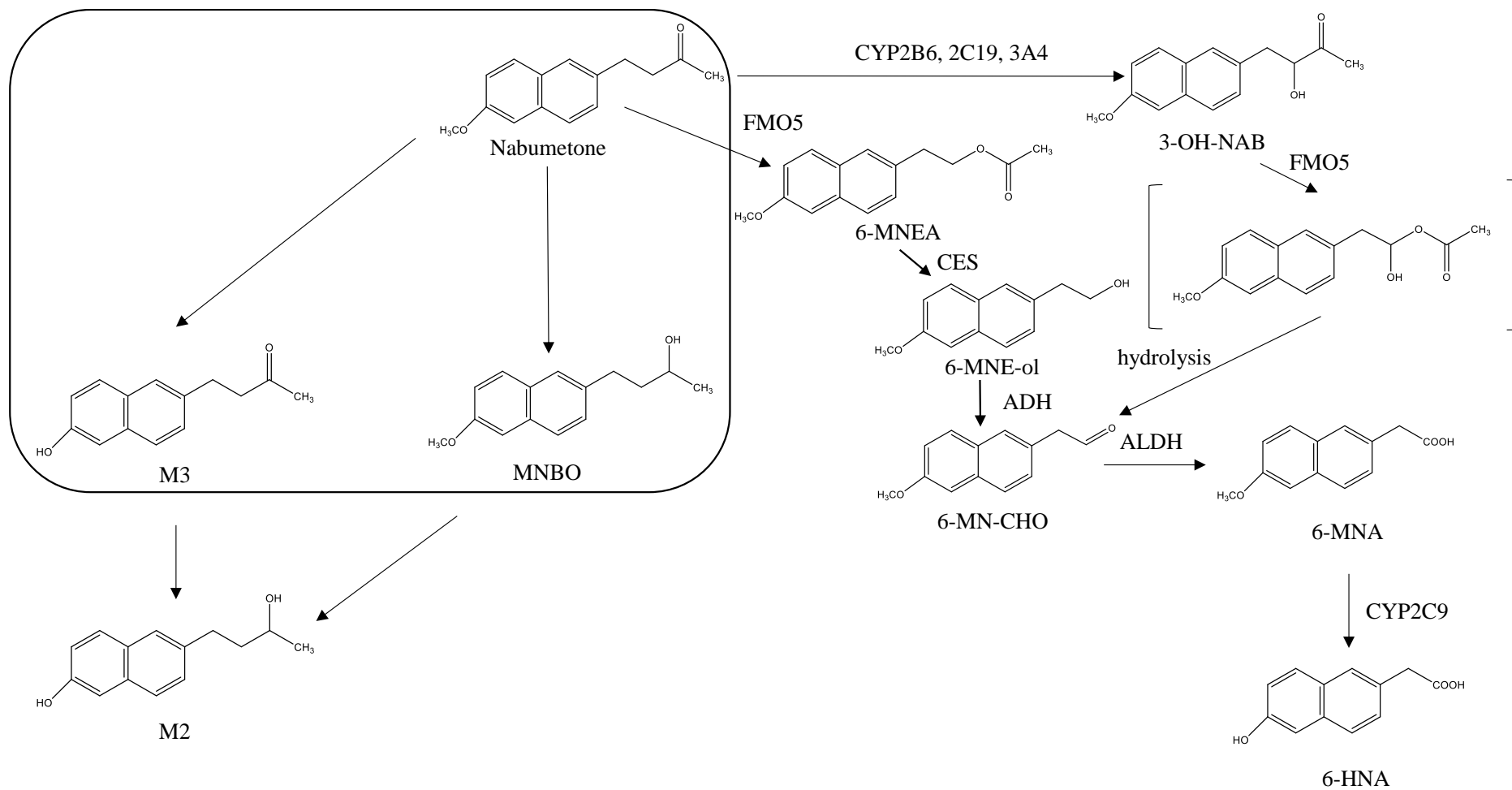


Fig. 35 Proposed metabolic pathways of nabumetone in human [18] .

第2節 実験材料と実験方法

3-2-1 試薬および酵素源

rac-MNBO および M3 は三和化学研究所から供与された。MNBO の光学分割体である(+)-MNBO と(-)-MNBO は、*rac*-MNBO を光学異性体分離用カラム (CHIRALPAK AS-H column, 10×250 mm, 5 μm particle size, ダイセル, 東京) を用いて分離・分取した。(+) -MNBO は(*R*)-MTPACl と(*S*)-MTPACl を用いて、ジアステレオマーの MTPA エステルに変換した。ジアステレオマーの MTPA エステルの ¹H NMR スペクトルを測定し、各シグナルを COSY により割り当てた。(+) -MNBO の絶対配置は、改良モッシャー法 [84] に従って *S* 体であると決定された。

Ethacrynic acid, flufenamic acid, 6α-methylprednisolone, 4-benzoylpyridine および metyrapone は東京化成工業より購入した。18β-Glycyrrhetic acid, methimazole, furafylline, α-naphthoflavone, quinidine および sulfaphenazole は Sigma-Aldrich Co. LLC. より購入した。TiCl₃ はキシダ化学(大阪) より購入した。Dicumarol, barbituric acid, pyrazole, quercetin, phenolphthalein, medroxyprogesterone acetate, 5β-cholanic acid-3α,7α-diol, cortisone, cortisol, acetohexamide, tolazamide, loxoprofen, ticlopidine, montelukast, diethyldithiocarbamate および troleandomycin は和光純薬工業より購入した。Ketoconazole は LKT Laboratories, Inc., (*S*)-(+)-*N*-3-benzylrivanol および *S*-mephentoin は Toronto Research Chemicals, Inc. (North York, ON, Canada) より購入した。Hydroxyhexamide は水素化ホウ素ナトリウムを用いて acetohexamide から合成した。

20 ドナープールドヒト肝マイクロソーム, 10 ドナープールドヒト肝サイトゾル, 個別ヒト肝マイクロソーム (HG3, HG74, HG95, HH13, HH47, HK37 および HG103) および個別ヒト肝サイトゾル (HH18, HG42, HG43, HK34, HG64, HH31, HH47 および HH35) は, BD Gentest Co. より購入した。ヒト CYP 発現系マイクロソームは, 大腸菌に発現させたもの (CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP2J2, CYP3A4 および CYP3A5) を Cypex より購入した。なお, 使用したヒト CYP 発現系マイクロソームは NADPH-cytochrome P450 reductase と cytochrome-*b*5 を共発現させたものである。

ヒト CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 および CYP3A4 に対する阻害抗体 (抗-ヒト CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 および CYP3A4 polyclonal 抗体) は日本農産工業より購入した。ヒト CYP2B6 に対する阻害抗体 (抗-ヒト CYP2B6 monoclonal 抗体) は BD Gentest Co. より購入した。

Silensomes™ (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 および CYP3A4) および Control-Silensomes™ は, Biopredic International より購入した。

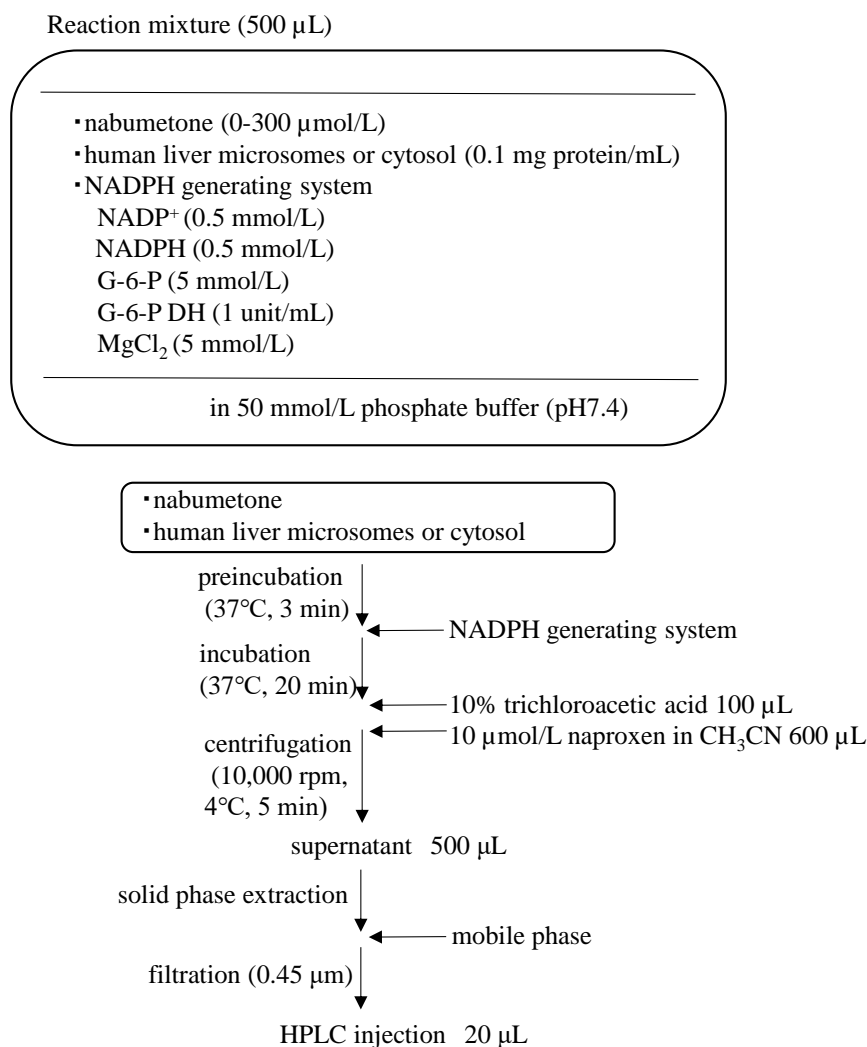
その他の試薬は, 特級または HPLC 分析用またはそれに相当する試薬を使用した。

3-2-2 ヒト肝マイクロソームおよびサイトゾルを用いた nabumetone から MNBO への *in vitro* 代謝実験

ヒト肝マイクロソームおよびサイトゾルによる nabumetone から MNBO への代謝活性は, 以下に示す反応条件で測定した。

Nabumetone (0, 10, 20, 50, 100, 200, 300 $\mu\text{mol/L}$), ヒト肝ミクロソームまたはサイトゾル (0.1 mg protein/mL), NADPH 生成系 (0.5 mmol/L NADP⁺, 0.5 mmol/L NADPH, 5 mmol/L G-6-P, 1 unit/mL G-6-P DH, 5 mmol/L MgCl₂) および 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.5 mL の反応液を 1.5 mL のプラスチックチューブで 37°C, 3 分間プレインキュベーションした後, NADPH 生成系を添加して反応を開始した. 37°C, 20 分間インキュベーションした後, 10%トリクロロ酢酸水溶液 100 μL および内部標準物質である 10 $\mu\text{mol/L}$ naproxen アセトニトリル溶液 600 μL を添加して反応を停止した. これを 4°Cで 10,000 rpm, 5 分間遠心分離し, 得られた上清を試料とした. 試料は 1-2-2 の方法と同様に前処理を行い, 生成した MNBO 量を HPLC で測定した (Scheme 18).

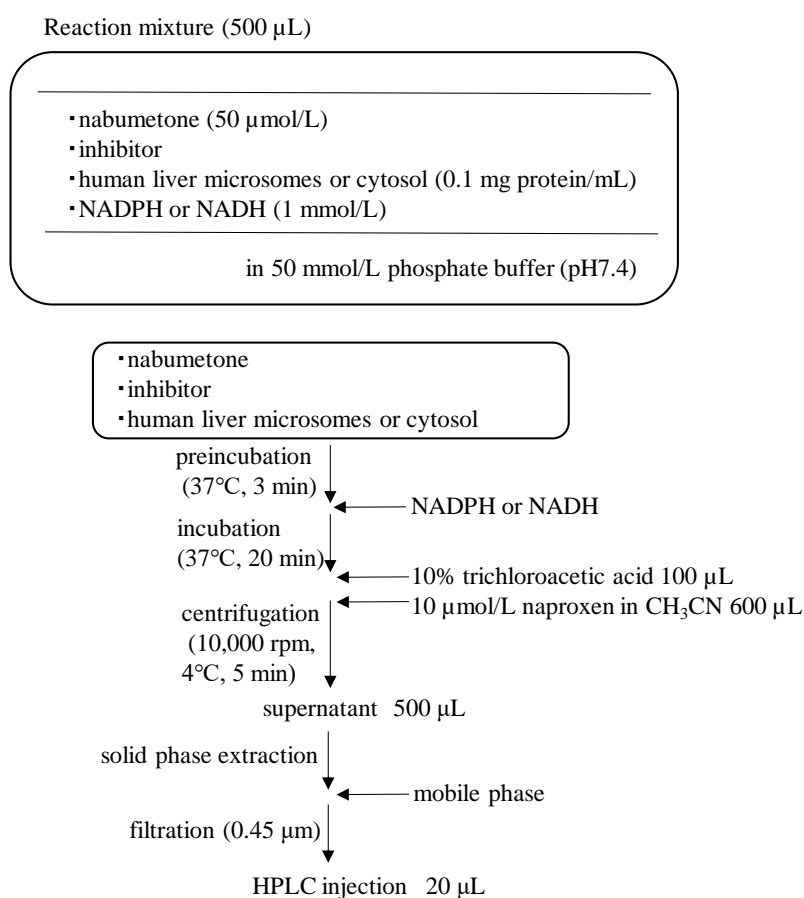
Nabumetone から MNBO への代謝に関する K_m および V_{max} は, Eadie-Hofstee plot から最小二乗法にて直線回帰することにより算定した.



Scheme 18 Procedure of *in vitro* metabolism experiment.

3-2-3 Nabumetone から MNBO への変換に対する化学阻害剤による影響

Nabumetone から MNBO への変換に対する化学阻害剤による影響は、以下の条件で測定した。Nabumetone (50 $\mu\text{mol/L}$)、ヒト肝マイクロソームまたはサイトゾル (0.1 mg protein/mL) および Table 11 と 12 の阻害剤 [85-99] を含む 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 37°C で 3 分間プレインキュベーションした後、NADPH (1 mmol/L) を添加して反応を開始した。阻害剤として pyrazole を用いた時のみ、補酵素として NADH (1 mmol/L) を添加した。インキュベーション時間は 20 分とし、1-2-2 と同様に前処理を行い、HPLC で MNBO 量を測定した。反応液中の有機溶媒濃度は 1% 以下になるように調整した。阻害剤の影響はそれぞれ阻害剤非添加のものをコントロールとして検討した (Scheme 19)。



Scheme 19 Procedure of *in vitro* inhibition experiment.

Table 11 Inhibitors used in the inhibition studies using human liver microsomes.

Inhibitor	Concentration (mM)	Enzyme
<i>N</i> -Benzylimidazole (NBI)	1	CYP
Methimazole (MTZ)	1	FMO
TiCl ₃ (TC)	0.064	NADPH-cytochrome P450 reductase
Dicumarol (DM)	0.1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase
18 β -Glycyrrhetic acid (GA)	0.2	11 β -HSD
Menadione (MD)	0.5	11 β -HSD

Table 12 Inhibitors used in the inhibition studies using human liver cytosol.

Inhibitor	Concentration (mM)	Enzyme
Barbituric acid (BA)	0.1	aldehyde dehydrogenase
Pyrazole (PZ)	0.1	alcohol dehydrogenase
Dicumarol (DM)	0.1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase
Quercetin (QC)	0.1	CBR
Menadione (MD)	0.5	CBR
Ethacrynic acid (EA)	1	CBR and AKRs
Phenolphthalein (PP)	0.02	AKR1C1, 1C2, 1C3 and 1C4
Flufenamic acid (FA)	0.02	AKR1C1, 1C2, 1C3 and 1C4
Medroxyprogesterone acetate (MPA)	0.02	AKR1C1, 1C2 and 1C4
5 β -Cholanic acid-3 α ,7 α -diol (CDCA)	0.05	AKR1C2

3-2-4 ミクロソーム中の 11 β -HSD 活性と nabumetone から MNBO への生成速度との相関性の検討

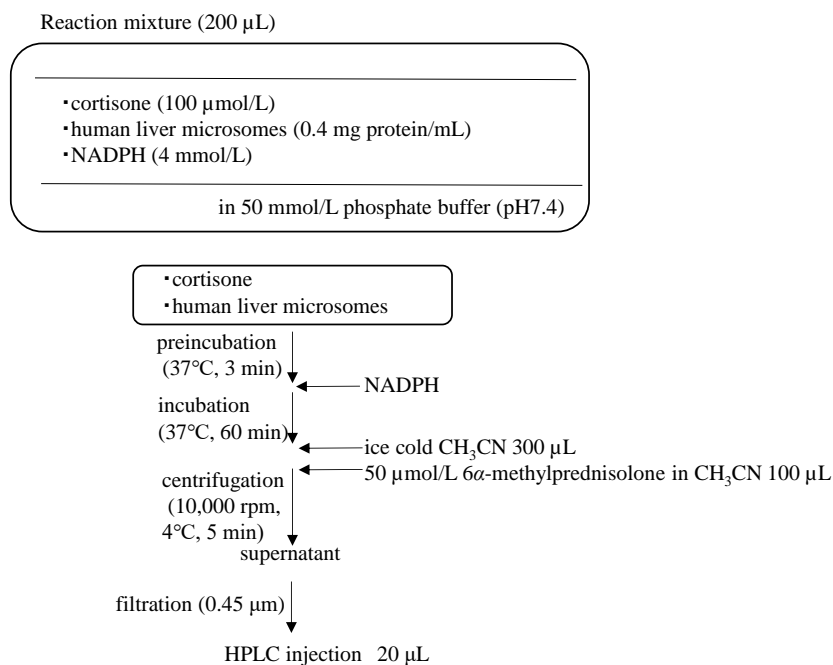
Nabumetone から MNBO への生成速度と 11 β -HSD の基質である cortisone の還元速度の相関性を、個別ヒト肝ミクロソーム (HG3, HG74, HG95, HH13, HH47, HK37 および HG103) を用いて検討した。

Nabumetone から MNBO への代謝活性は、3-2-2 の方法に従い、nabumetone 濃度は 50 μ mol/L で実施した。

Cortisone の還元活性は、cortisone (100 μ mol/L)、個別ヒト肝ミクロソーム (0.4 mg protein/mL)、NADPH (4 mmol/L) および 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.2 mL の反応液で測定した。上記の反応液を 37 $^{\circ}$ C、3 分間プレインキュベーションした後、NADPH の添加により反応を開始した。37 $^{\circ}$ C、60 分間インキュベーションの後、氷冷したアセトニトリル 300 μ L および内部標準物質である 50 μ mol/L 6 α -methylprednisolone アセトニトリル溶液 100 μ L を添加して、反応を

停止した。反応液を 4°C で 10,000 rpm, 5 分間遠心分離し, 得られた上清をメンブランフィルター (0.45 μm) でろ過し, HPLC で測定した (Scheme 20)。

決定係数 (r^2) は 2-2-6 と同様の方法で算出した。

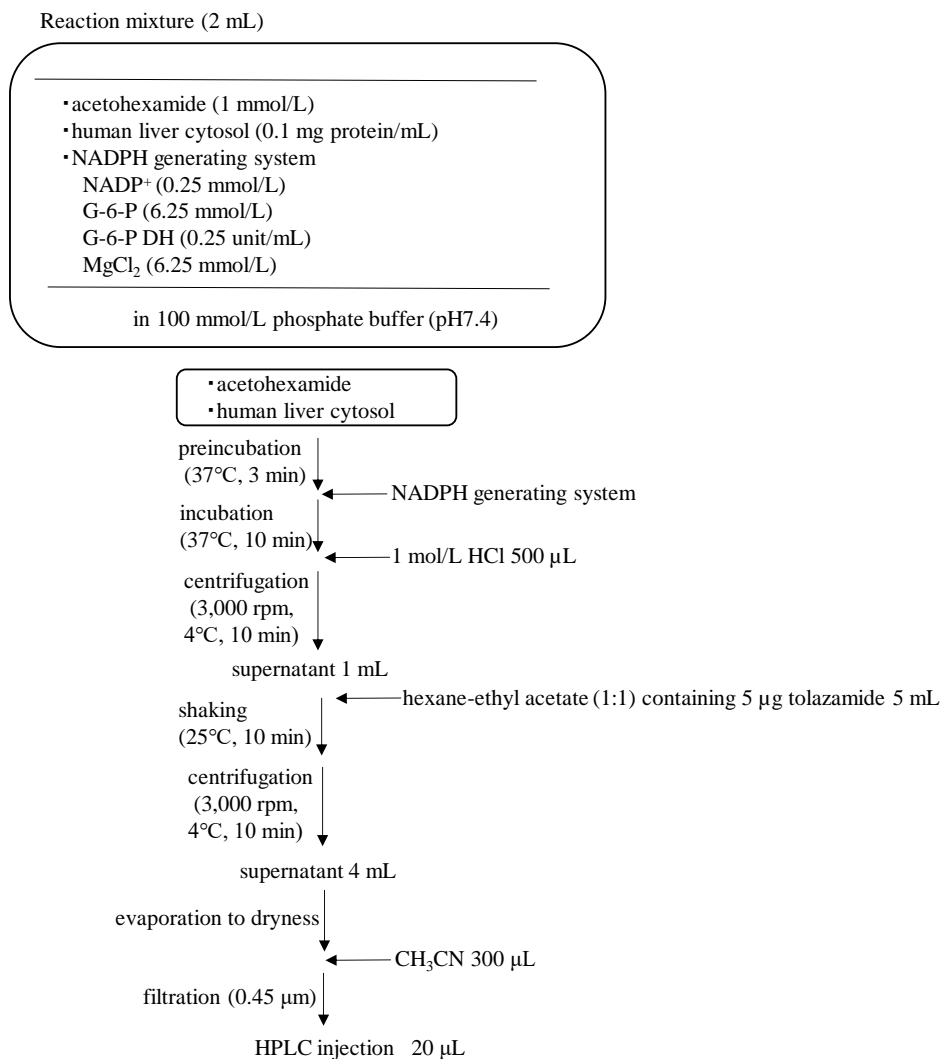


Scheme 20 Procedure for measurement of cortisone reductive activity.

3-2-5 サイトゾル中の CBR および AKR1C 活性と nabumetone から MNBO への生成速度との相関性の検討

Nabumetone から MNBO への生成速度と CBR および AKR1C の基質である acetohexamide の還元活性との相関性を個別ヒト肝サイトゾル (HH18, HG42, HG43, HK34, HG64, HH31, HH47 および HH35) を用いて検討した。

Nabumetone から MNBO への代謝活性は, 3-2-2 の方法に従い, nabumetone 濃度は 50 μmol/L で実施した。



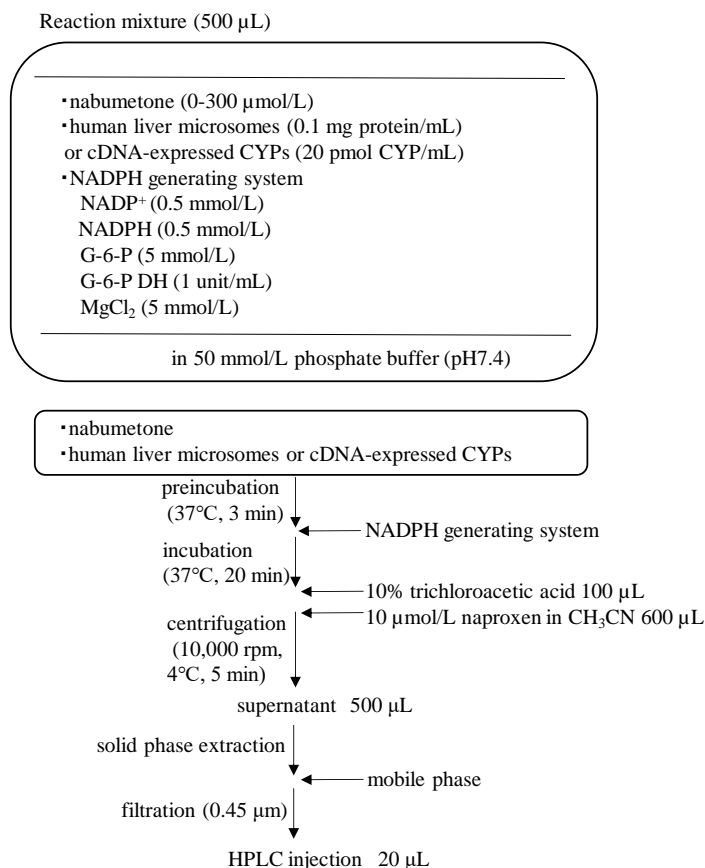
Scheme 21 Procedure for measurement of acetoheaxamide reductive activity.

Acetoheaxamide の還元活性の測定は、Imamura らの方法 [100] に従い行った。Acetoheaxamide の還元活性は、acetoheaxamide (1 mmol/L)、個別ヒト肝ミクロソーム (0.1 mg protein/mL)、NADPH 生成系 (0.25 mmol/L NADP⁺, 6.25 mmol/L glucose-6-phosphate, 6.25 mmol/L MgCl₂, 0.25 unit/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase) および 100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 2 mL の反応液で測定した。上記の反応液を 37°C で 3 分間プレインキュベーションした後、NADPH 生成系を添加して反応を開始した。37°C、10 分間インキュベーションした後、1 mol/L 塩酸 500 μL を添加して反応を停止し、3,000 rpm、4°C、10 分間遠心分離後、上清 1 mL を分取した。これに内部標準物質である tolazamide 5 μg を含む hexane-ethyl acetate (1:1) 5 mL を加え、25°C で 10 分間振とうした後、3,000 rpm、4°C、10 分間遠心分離した。上層 (有機溶媒相) 4 mL を分取し、減圧下で溶媒を留去後、残渣を 300 μL のアセトニトリルに溶解し、メンブランフィルター (0.45 μm) でろ過した後、HPLC で測定した (Scheme 21)。

Ethacrynic acid, metyrapone, loxoprofen および 4-benzoylpyridine の還元活性の測定は Ohara らの

方法 [101] に従って行った。個別ヒト肝サイトゾル (0.4 mg protein/mL), 0.1 mmol/L NADPH および 1.5 mmol/L 基質を含む 100 mmol/L リン酸緩衝液 (pH6.0) 中で, 検出波長 340 nm における NADPH の吸光度を経時的に測定し, その減少から還元活性を算出した。

決定係数 (r^2) は 2-2-6 と同様な方法で算出した。



Scheme 22 Procedure of *in vitro* metabolism experiment.

3-2-6 ヒト肝マイクロソームおよび CYP 発現系マイクロソームを用いた nabumetone から M3 への *in vitro* 代謝実験

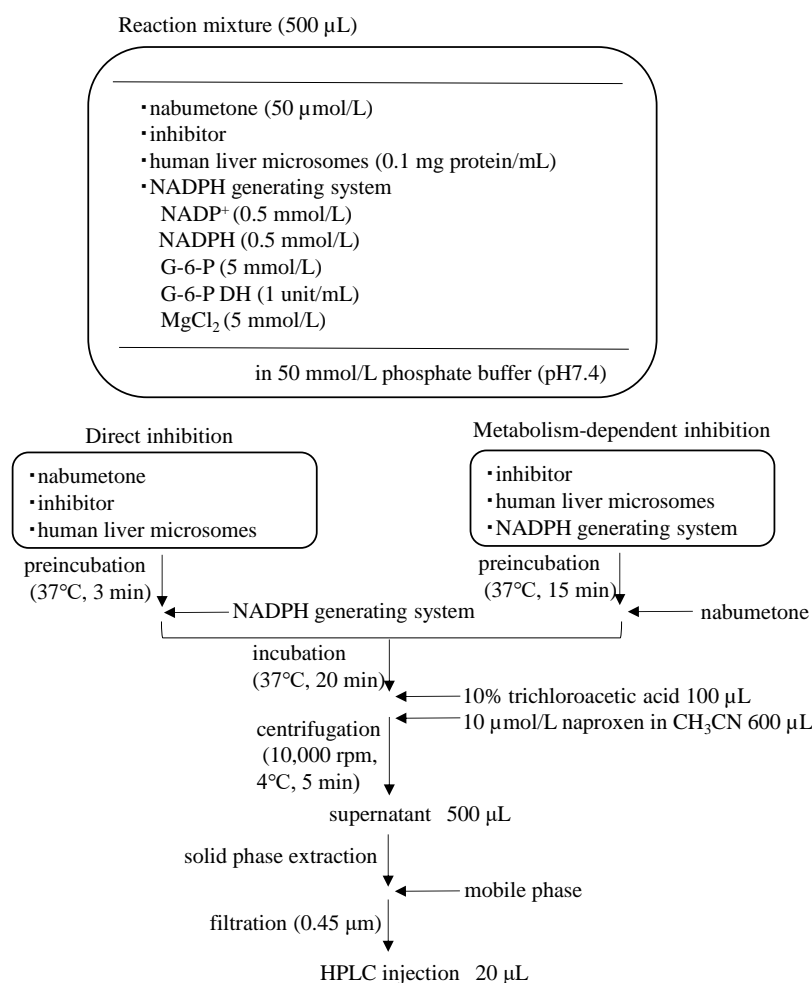
ヒト肝マイクロソームによる nabumetone から M3 への代謝活性は, 以下に示す反応条件で測定した。

Nabumetone (0, 10, 20, 50, 100, 200, 300 µmol/L), ヒト肝マイクロソーム (0.1 mg protein/mL), NADPH 生成系 (0.5 mmol/L NADP⁺, 0.5 mmol/L NADPH, 5 mmol/L G-6-P, 1 unit/mL G-6-P DH, 5 mmol/L MgCl₂) および 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.5 mL の反応液を 1.5 mL のプラスチックチューブで調製し, 37°C, 3 分間プレインキュベーションした後, NADPH 生成系を添加して反応を開始した。37°Cで 20 分間インキュベーションした後, 10%トリクロロ酢酸水溶液 100 µL および内部標準物質である 10 µmol/L naproxen アセトニトリル溶液 600 µL を添加して,

反応を停止した。反応液を 4°C で 10,000 rpm, 5 分間遠心分離し, 得られた上清を試料とした。

ヒト CYP 発現系マイクロソームによる代謝実験は, nabumetone 濃度 200 $\mu\text{mol/L}$, 各分子種発現系の濃度は 20 pmol CYP/mL で実施し, 反応時間は 60 分とした。試料は 1-2-2 の方法と同様に前処理を行い, 生成した M3 を HPLC で測定した (Scheme 22)。

Nabumetone から M3 の生成は Michaelis-Menten 速度論に従ったので, nabumetone から M3 への代謝に関する K_m および V_{max} を, Eadie-Hofstee plot から最小二乗法にて直線回帰することにより算定した。

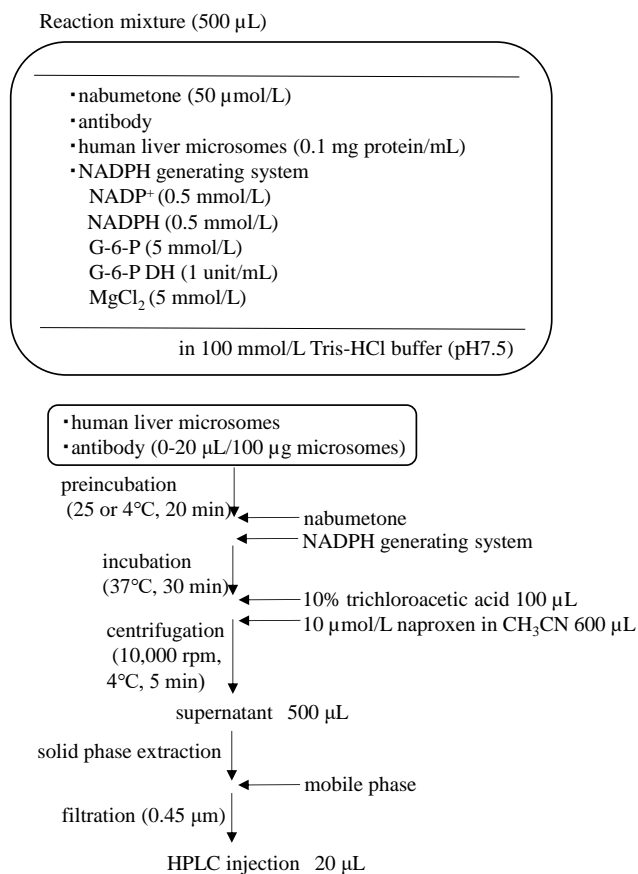


Scheme 23 Procedure of *in vitro* inhibition experiment.

3-2-7 Nabumetone から M3 への変換に対する化学阻害剤の影響

化学阻害剤による M3 生成阻害の検討は, nabumetone (50 $\mu\text{mol/L}$), ヒト肝マイクロソーム (0.1 mg protein/mL), 阻害剤 [46-50, 102-104] (Table 13) および 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.5 mL の反応液で行った。37°C で 3 分間プレインキュベーションした後, NADPH 生成系を添加し反応を開始した。インキュベーション時間は 20 分とし, 試料は 1-2-2 の方法と同様に前処理を行い, HPLC で測定した (Scheme 23)。代謝依存性阻害剤 (mechanism based inhibitor) である

furafylline, ticlopidine , diethyldithiocarbamate および troleandomycin を用いた阻害実験では, ミクロソームと NADPH 生成系を 37°C で 15 分間プレインキュベーションした後に, 基質を添加して反応を開始させた. 反応液中の有機溶媒濃度は 1% 以下になるようにし, 阻害剤の影響はそれぞれ阻害剤非添加のものをコントロールとした.



Scheme 24 Procedure of *in vitro* inhibition experiment using antibody.

Table 13 Inhibitors used in the inhibition studies.

Inhibitor	Concentration (μM)	Enzyme
Furafylline* (FUR)	0.1	CYP1A2
α -Naphthoflavone (α -NF)	1	CYP1A2
Ticlopidine* (TICP)	0.1	CYP2B6
Montelukast (MK)	0.03	CYP2C8
Sulfaphenazole (SFZ)	10	CYP2C9
(S)-(+)-N-3-Benzylmirtanol (N-BN)	1	CYP2C19
S-Mephenytoin (S-MF)	50	CYP2C19
Quinidine (QUIN)	0.1	CYP2D6
Diethyldithiocarbamate* (DETC)	10	CYP2E1
Ketoconazole (KCZ)	1	CYP3A4
Troleandomycin* (TAM)	50	CYP3A4

* : metabolism-dependent inhibitor

3-2-8 Nabumetone から M3 への変換に対する阻害抗体の影響

種々の濃度の阻害抗体 (抗-ヒト CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 および CYP3A4 抗体) を用いてヒト肝ミクロソームにおける nabumetone から M3 への変換に対する阻害実験を行った。ヒト肝ミクロソームと阻害抗体を 25°C で 20 分間プレインキュベーションした後, nabumetone および NADPH 生成系を添加し, 37°C で 100 mmol/L Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 中で 30 分間インキュベーションした。CYP2B6 抗体のみ 4°C でプレインキュベーションを行った。試料は 1-2-2 の方法と同様に前処理を行い, HPLC で M3 量を測定した (Scheme 24)。プレインキュベーションの条件は, それぞれの抗体のデータシートに記載された手順に従った。Nabumetone 濃度は 50 $\mu\text{mol/L}$ で実施し, 阻害抗体は, ミクロソーム 100 μg に対して 0-20 μL 加えた。なお, ネガティブコントロールとして CYP1A2, 2C9, 2C19 および 3A4 抗体ではウサギ血清, 2B6 抗体では 25 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.5) を用いた。

3-2-9 Silensomes™を用いた nabumetone から M3 への変換に関する各 CYP 分子種の寄与率の検討

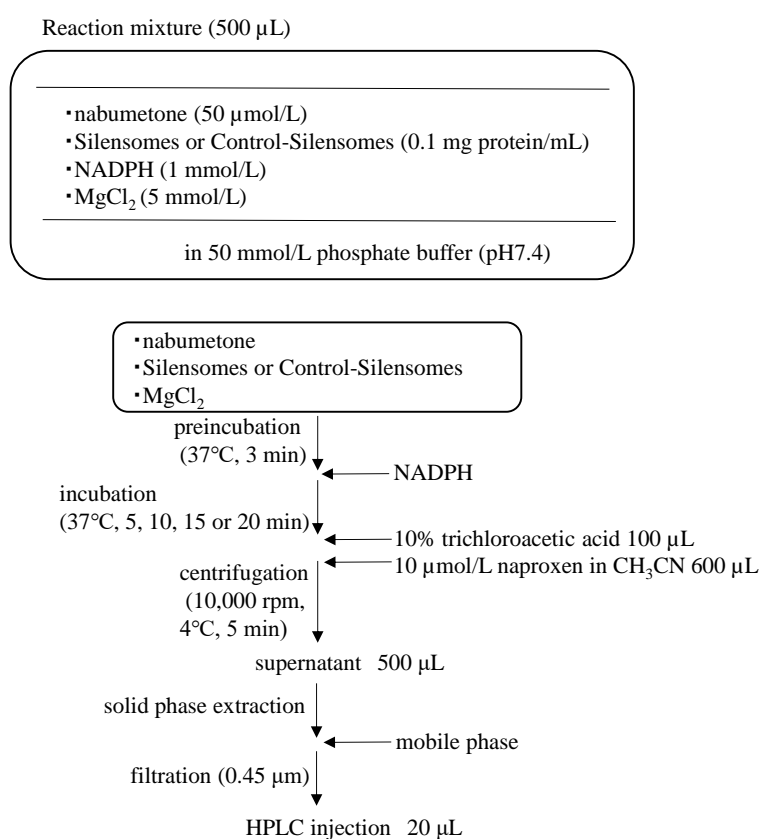
Silensomes™を用いた nabumetone から M3 への変換に関する各 CYP 分子種の寄与率の検討は, 以下に示す反応条件で行った。Nabumetone (50 $\mu\text{mol/L}$), Silensomes™または Control-Silensomes™ (0.1 mg protein/mL) と NADPH 水溶液 (1 mmol/L), MgCl_2 水溶液 (5 mmol/L) および 50 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む 0.5 mL の反応液を 1.5 mL のプラスチックチューブで 37°C, 3 分間プレインキュベーションした後, NADPH の添加により反応を開始した。37°C で 5, 10, 15 または 20 分間インキュベーションした後, 10%トリクロロ酢酸水溶液 100 μL および

内部標準物質である 10 μmol/L naproxen アセトニトリル溶液 600 μL を添加して、反応を停止した。反応液は 4°C で 10,000 rpm, 5 分間遠心分離し、得られた上清を試料とした。試料は 1-2-2 の方法と同様に前処理を行い、HPLC で測定した (Scheme 25)。

CYP 分子種の寄与率は式 (1) により算出した。

$$\text{Contribution}(\%) = \left(1 - \left(\frac{CL_{int} SiL}{CL_{int} cSiL} \right) \right) \times 100 \quad (1)$$

Silensomes™ (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 および CYP3A4) の固有クリアランスを $CL_{int} SiL$, Control-Silensomes™ の固有クリアランスを $CL_{int} cSiL$ とする。



Scheme 25 Procedure of *in vitro* metabolism experiment using Silensomes™.

3-2-10 HPLC の定量条件

MNBO および M3 の定量は、1-2-10 の方法に従って行った。移動相は、MNBO では 20 mmol/L リン酸水素二カリウム水溶液 (リン酸で pH 3.0 に調整) : アセトニトリル=1:1, M3 では 20 mmol/L リン酸水素二カリウム水溶液 (リン酸で pH 3.0 に調整) : アセトニトリル=3:2 を用いた。

MNBO の光学異性体の分離定量は、1-2-10 と同じ HPLC 装置 (検出器は UV-Vis 検出器 (SPD-

10Avp) を用いた.) を用いて, カラムは CHIRALPAK AS-RH column (4.6×150 mm, 5 μm particle size, ダイセル, 東京), 移動相は, 水 : アセトニトリル=55 : 45 で測定した. カラム温度は 40°C, 流速は 1.0 mL/min, 波長 320 nm に設定した.

Cortisol は, Piwowarska らの方法 [105] を若干変更して定量した. 1-2-10 と同じ HPLC 装置 (検出器は UV-Vis 検出器 (SPD-10Avp) を用いた.) とカラムを用いて, 移動相は, 水 : アセトニトリル=7 : 3 で測定した. カラム温度は 40°C, 流速は 1.0 mL/min, 波長 252 nm に設定した.

Hydroxyhexamide は, Takagishi らの方法 [106] を若干変更して定量した. 1-2-10 と同じ HPLC 装置 (検出器は UV-Vis 検出器 (SPD-10Avp) を用いた.) とカラムを用いて, 移動相は, 0.2% 酢酸水溶液 : アセトニトリル= 53 : 47 で測定した. カラム温度は 30°C, 流速は 1.0 mL/min, 波長 230 nm に設定した.

3-2-11 統計解析

阻害実験におけるコントロール (阻害剤非添加) との比較は, 統計ソフト R (version 3.5.1) を用いて対応のない *t* 検定またはダネットの多重比較により評価した. いずれの場合も, 有意水準は $p < 0.01$ とした.

第3節 結果・考察

3-3-1 Nabumetone から 4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)butan-2-ol (MNBO) への変換に関する検討

3-3-1-1 Nabumetone から MNBO への変換における酵素キネティックパラメータの算出

ヒト肝ミクロソームおよびサイトゾルを用いて *in vitro* 代謝実験を行い, nabumetone から MNBO への NADPH 依存性の還元代謝の酵素キネティックパラメータを算出した. MNBO 生成速度と nabumetone 濃度の Michaelis-Menten plot を Fig. 36 に示す. ヒト肝ミクロソームおよびサイトゾル, どちらの場合も MNBO の生成速度は基質濃度の上昇に伴い飽和する傾向を示し, Michaelis-Menten 速度論に従った. Eadie-Hofstee plot より求めた K_m , V_{max} および固有クリアランス (V_{max}/K_m) を Table 14 に示す.

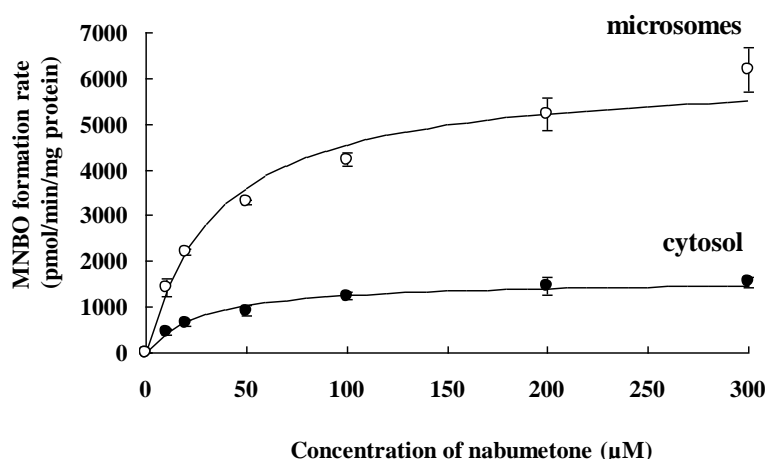


Fig. 36 Michaelis-Menten plots for MNBO formation from nabumetone in human microsomes and cytosol.

Each point represents the mean \pm S.D. (n=3).

Table 14 Michaelis-Menten kinetic parameters of MNBO formation from nabumetone in human liver microsomes and cytosol.

Subcellular fraction	K_m (μM)	V_{max} (pmol/min/mg protein)	V_{max}/K_m ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	(S)-/(R)-MNBO
Microsomes	35.0 ± 5.7	6136.7 ± 306.1	177.5 ± 20.6	74/26
Cytosol	27.1 ± 2.0	1592.8 ± 105.3	59.1 ± 7.4	67/32

Data are the mean \pm S.D. (n=3).

ヒト肝マイクロソームおよびサイトゾルにおける K_m 値は、それぞれ $35.0\ \mu\text{M}$ および $27.1\ \mu\text{M}$ であった。ヒト肝マイクロソームにおける V_{max} はヒト肝サイトゾルの値の約 4 倍であり、 $V_{max}K_m$ 値はヒト肝サイトゾルの値より約 3 倍高かった。ヒト肝マイクロソームおよびサイトゾルは、どちらも *S* 体と *R* 体の両方の光学異性体を生成した。*(S)*-/*(R)*-MNBO の生成比はマイクロソームで 74/26、サイトゾルで 67/33 であった。

また、サイトゾルでの MNBO 生成における補酵素の影響を検討したところ、NADPH だけでなく NADH においても同程度の MNBO の生成が観察された (Fig. 37)。AKR1C4 によって触媒される *(S)*-1-indanol の脱水素化反応は、NADPH または NADH を補酵素として用いたときに同様の速度で進行することが報告されている [85]。今回のサイトゾル中で nabumetone から MNBO への還元代謝が、NADPH と NADH で同様の速度で進行したという結果は、nabumetone から MNBO の生成に AKR1C4 が関与していることを示唆した。

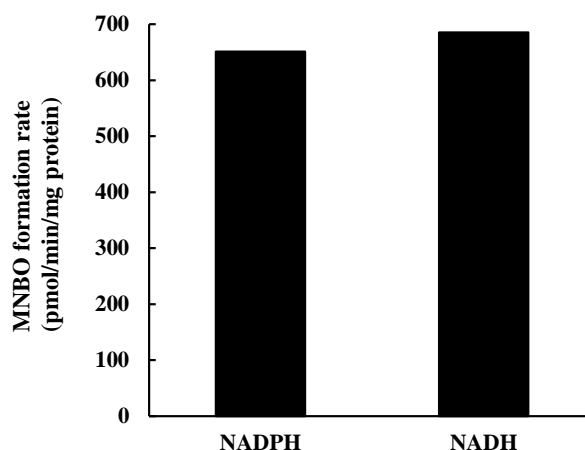


Fig. 37 Formation of MNBO from nabumetone with NADPH or NADH in human liver cytosol. Each bar represents the mean of duplicate incubations.

3-3-1-2 Nabumetone から MNBO への変換に対する化学阻害剤の影響

化学的阻害剤 (Table 11 再掲) を添加してヒト肝マイクロソームにおける nabumetone の *in vitro* 代謝実験を行った (Fig. 38)。マイクロソーム中の MNBO の生成は、NBI (P450 阻害剤)、methimazole (FMO 阻害剤)、 TiCl_3 (NADPH-cytochrome P450 reductase 阻害剤) および dicumarol (NAD(P)H:quinone oxidoreductase 阻害剤) では阻害されなかった。一方、 11β -HSD の阻害剤である 18β -glycyrrhetic acid と menadione でコントロールに比べてそれぞれ 78.5%、52.3%低下した。

Table 11 Inhibitors used in the inhibition studies using human liver microsomes. (p. 76 再掲)

Inhibitor	Concentration (mM)	Enzyme
<i>N</i> -Benzylimidazole (NBI)	1	CYP
Methimazole (MTZ)	1	FMO
TiCl ₃ (TC)	0.064	NADPH-cytochrome P450 reductase
Dicumarol (DM)	0.1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase
18 β -Glycyrrhetic acid (GA)	0.2	11 β -HSD
Menadione (MD)	0.5	11 β -HSD

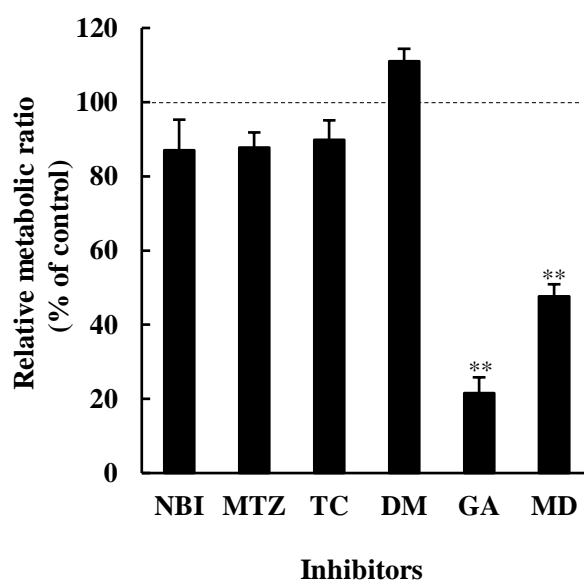


Fig. 38 Effect of enzyme inhibitors on MNBO formation from nabumetone in human microsomes.

Each bar represents the mean \pm S.D. (n=3). ** $p < 0.001$, compared with no treatment of each inhibitor.

ヒト肝サイトゾルでもミクロソームと同様に阻害実験 (Table12 再掲) を行った (Fig. 39). サイトゾル中の MNBO の生成は, barbituric acid (aldehyde dehydrogenase 阻害剤), pyrazole (alcohol dehydrogenase 阻害剤) および dicumarol (NAD(P)H:quinone oxidoreductase 阻害剤) によって阻害されなかった. カルボニル還元酵素 (CBR) 阻害剤である quercetin, menadione および ethacrynic acid でコントロールに比べてそれぞれ 64.0%, 77.4% および 78.5% 低下し, AKR1C1-1C4 阻害剤である phenolphthalein, flufenamic acid ではそれぞれ 47.1, 43.8% 低下した. AKR1C1, 1C2 および 1C4 阻害剤である medroxyprogesterone acetate ではコントロール値と比べて 56.2% の阻害が観られたが, AKR1C2 阻害剤である 5 β -cholanic acid-3 α ,7 α -diol では阻害は観られなかった.

Table 12 Inhibitors used in the inhibition studies using human liver cytosol. (p. 76 再掲)

Inhibitor	Concentration (mM)	Enzyme
Barbituric acid (BA)	0.1	aldehyde dehydrogenase
Pyrazole (PZ)	0.1	alcohol dehydrogenase
Dicumarol (DM)	0.1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase
Quercetin (QC)	0.1	CBR
Menadione (MD)	0.5	CBR
Ethacrynic acid (EA)	1	CBR and AKRs
Phenolphthalein (PP)	0.02	AKR1C1, 1C2, 1C3 and 1C4
Flufenamic acid (FA)	0.02	AKR1C1, 1C2, 1C3 and 1C4
Medroxyprogesterone acetate (MPA)	0.02	AKR1C1, 1C2 and 1C4
5 β -Cholanic acid-3 α ,7 α -diol (CDCA)	0.05	AKR1C2

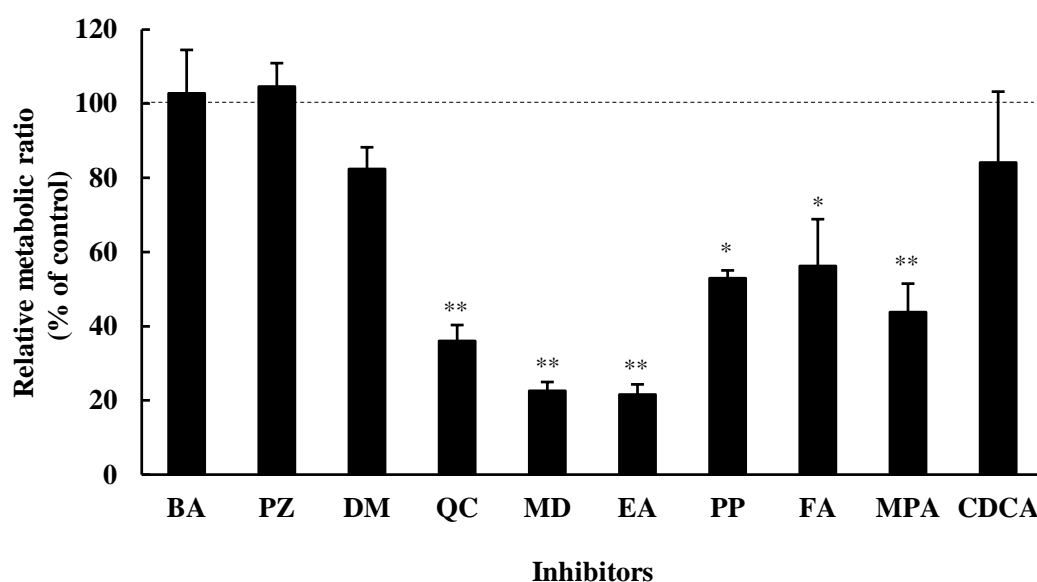


Fig. 39 Effect of enzyme inhibitors on MNBO formation from nabumetone in human cytosol.

Each bar represents the mean \pm S.D. (n=3). * p <0.01, ** p <0.001, compared with no treatment of each inhibitor.

阻害実験の結果より, nabumetone から MNBO への NADPH 依存性の還元代謝は, ミクロソーム中では 11 β -HSD, サイトゾル中では CBR および AKR1C の関与が示唆された. サイトゾル中では, nabumetone の還元活性は, CBR および AKR を阻害する ethacrynic acid によって最も効果的に阻害された. また, phenolphthalein, medroxyprogesterone acetate により, それぞれコントロールの 47.1%, 56.2%阻害された. Phenolphthalein は, AKR1C1, 1C2 および 1C3 よりも AKR1C4 に対

してより選択的に阻害することが報告されている [92]. また, medroxyprogesterone acetate は AKR1C1, 1C2 および 1C4 の阻害剤であり, AKR1C4 に特異性が高いことが報告されている [85]. Phenolphthalein および medroxyprogesterone acetate を用いた阻害実験の結果からは, NADPH 依存性の還元代謝に AKR1C4 の関与が高いと考えられたが, AKR1C1, 1C2 および 1C3 に選択性があり, AKR1C4 の弱い阻害剤である flufenamic acid [86] でも阻害が観られたことから, AKR1C4 だけでなく他の分子種も関与していることが示唆された. 一方, AKR1C2 を選択的に阻害する 5 β -cholanic acid-3 α ,7 α -diol [86] で阻害が観られなかったことから, AKR1C2 の関与の可能性は低いと推察した.

3-3-1-3 ミクロソーム中の 11 β -HSD 活性と nabumetone から MNBO への生成速度との相関性の検討

7人のヒト個別ミクロソームを用いて nabumetone から MNBO への生成速度と 11 β -HSD の基質である cortisone の還元代謝活性との相関性を検討した (Fig. 40). MNBO の生成速度と cortisol の生成速度に相関が認められた ($r^2=0.93$, $p<0.0005$) ことから, ヒトにおける nabumetone から MNBO への変換には, ミクロソーム中の 11 β -HSD が関与していることが示唆された.

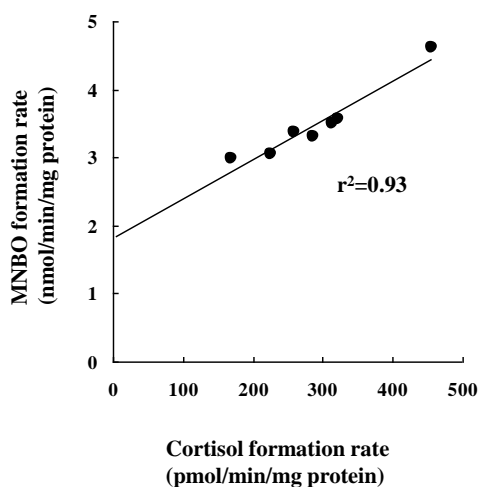


Fig. 40 Correlation between 11 β -HSD activity and MNBO formation from nabumetone by liver microsomes obtained from seven human samples.

3-3-1-4 サイトゾル中の CBR および AKR1C 活性と nabumetone から MNBO への生成速度との相関性の検討

6-8人のヒト個別サイトゾルを用いて nabumetone から MNBO への生成速度と CBR および AKR1C の種々基質の還元代謝活性との相関性を検討した (Fig. 41). AKR1C1, 1C2 および 1C4 の基質である acetohexamide, AKR1C1 および 1C4 の基質である ethacrynic acid, CBR1 および

AKR1C4 の基質である metyrapone, CBR, AKR1C1, 1C2 および 1C4 の基質である loxoprofen, CBR の基質である 4-benzoylpyridine を用いた. MNBO の生成速度と hydroxyhexamide の生成速度に相関が認められた ($r^2=0.92$, $p<0.0005$). また, MNBO の生成速度と ethacrynic acid ($r^2=0.93$, $p<0.005$), metyrapone ($r^2=0.93$, $p<0.005$) および loxoprofen ($r^2=0.86$, $p<0.01$) の還元速度にも相関性が観られた. 一方 CBR の基質である 4-benzoylpyridine とは相関性が認められなかった ($r^2=0.24$).

今回の相関実験では, Fig. 39 で示したように nabumetone から MNBO への生成は, CBR 阻害剤である quercetin, menadione および ethacrynic acid で阻害が観察された. また, ヒト肝臓では CBR が高度に発現しており, その発現は AKR1C よりもワンオーダー高いことが知られている [95]. Nabumetone から MNBO への生成速度と CBR の基質である 4-benzoylpyridine の還元代謝活性との間には統計学的に有意な相関が観られなかったが, サイトゾル中の CBR もある程度関与している可能性がある.

以上の結果より, nabumetone から MNBO への還元代謝は, AKR1C4 と CBR により触媒されることが示唆された.

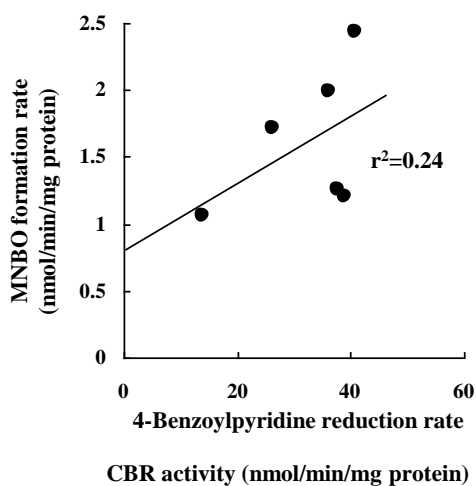
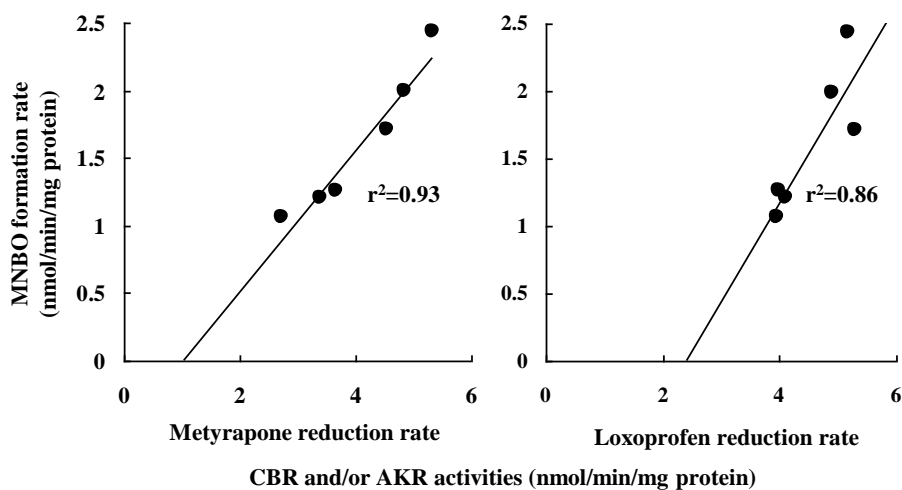
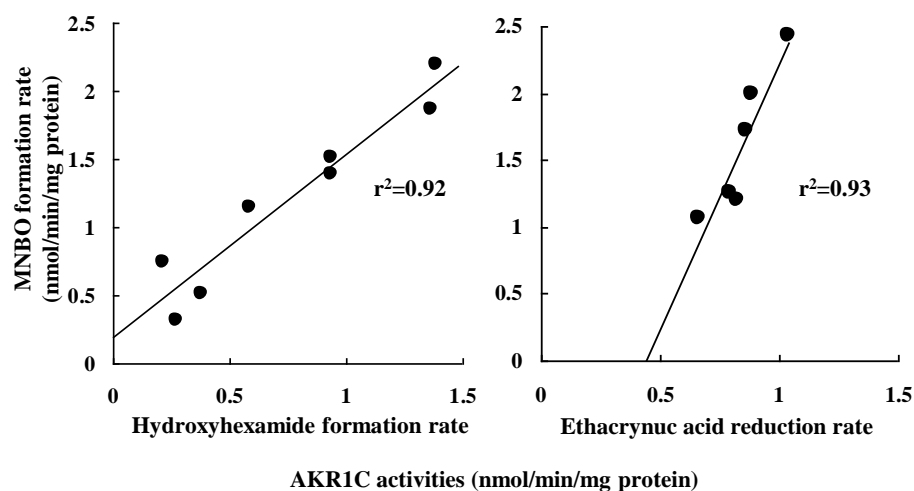


Fig. 41 Correlation between CBR and/or AKR1C activities and MNBO formation from nabumetone by liver cytosol obtained from six-eight human samples.

3-3-2 Nabumetone から 4-(6-hydroxy-2-naphthyl)butan-2-one (M3) への変換に関する検討

3-3-2-1 ヒト肝ミクロソームを用いた nabumetone から M3 への変換における酵素キネティックパラメータの算出

ヒト肝ミクロソームを用いて nabumetone から M3 への *in vitro* 代謝実験を行い、M3 への酸化的代謝の酵素キネティックパラメータを算出した。Fig. 42 に示すとおり、nabumetone から M3 への変換は Michaelis-Menten 速度論に従った。Eadie-Hofstee plot より求めた K_m 、 V_{max} および固有クリアランス (V_{max}/K_m) を Table 15 に示す。

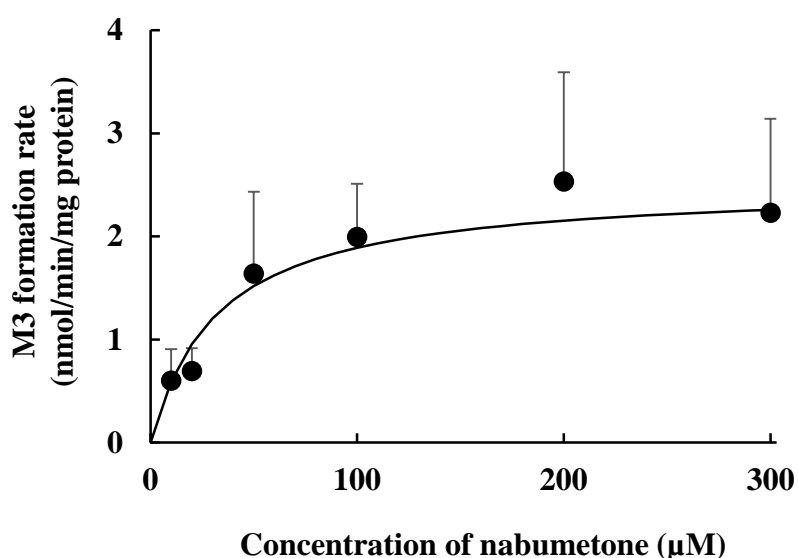


Fig. 42 Michaelis-Menten plot for M3 formation from nabumetone in human microsomes. Each point represents the mean \pm S.D. (n=3).

Table 15 Michaelis-Menten kinetic parameters of M3 formation from nabumetone in human liver microsomes.

K_m (μM)	V_{max} (nmol/min/mg/protein)	V_{max}/K_m ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg protein}$)
32.4 \pm 3.0	2.5 \pm 0.9	78.9 \pm 32.8

Data are the mean \pm S.D. (n=3).

3-3-2-2 ヒト CYP 発現系ミクロソームを用いた nabumetone から M3 への *in vitro* 代謝実験

ヒト CYP 発現系ミクロソームを用いて、nabumetone から M3 代謝に関与する CYP 分子種について検討した (Fig. 43) .

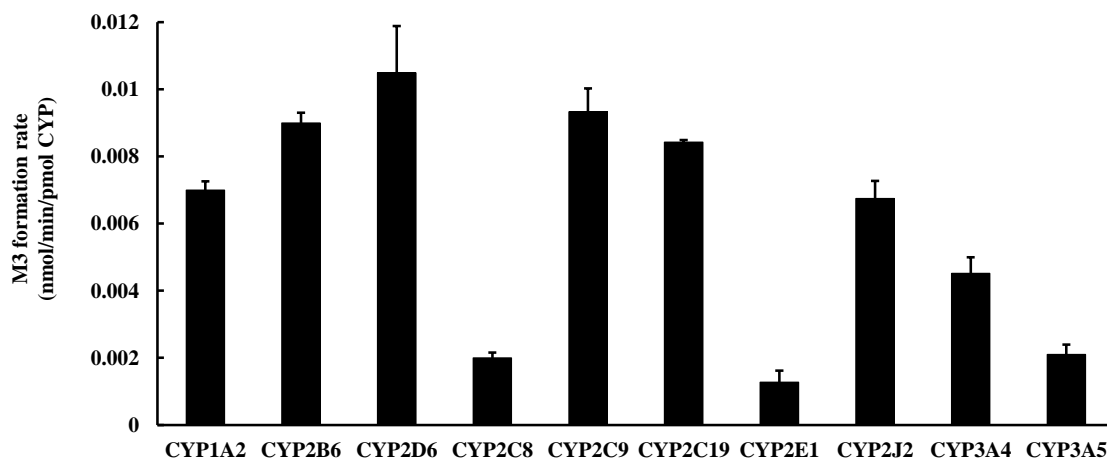


Fig. 43 Formation of M3 from nabumetone by cDNA-expressed CYPs.
Each bar represents the mean \pm S.D. (n=3).

複数の CYP 分子種で M3 の生成が観察された。一方、CYP 発現系で得られた結果は、発現量の違いなどにより、ヒト肝ミクロソームで得られる結果と必ずしも一致しないことが報告されている [61-65, 107]。CYP 発現系で得られた結果からヒト肝ミクロソームで得られる結果を予測するためには、何らかの補正が必要となる [45, 108-111]。そこで、Rodrigues らの方法 [45] に従って、関与するそれぞれの CYP 分子種について、発現系における代謝活性とその分子種のヒト肝ミクロソームにおける発現量を乗じた値を求め、その合計に対するそれぞれの分子種の比率を分子種の寄与率として算出した。ヒト CYP 発現系ミクロソームを用いた代謝実験の結果から求めた各 CYP 分子種の寄与率は、CYP2C9 が約 36% と最も高く、次いで CYP3A4, CYP2B6, CYP1A2, CYP2C19 の順であった (Fig. 44)。

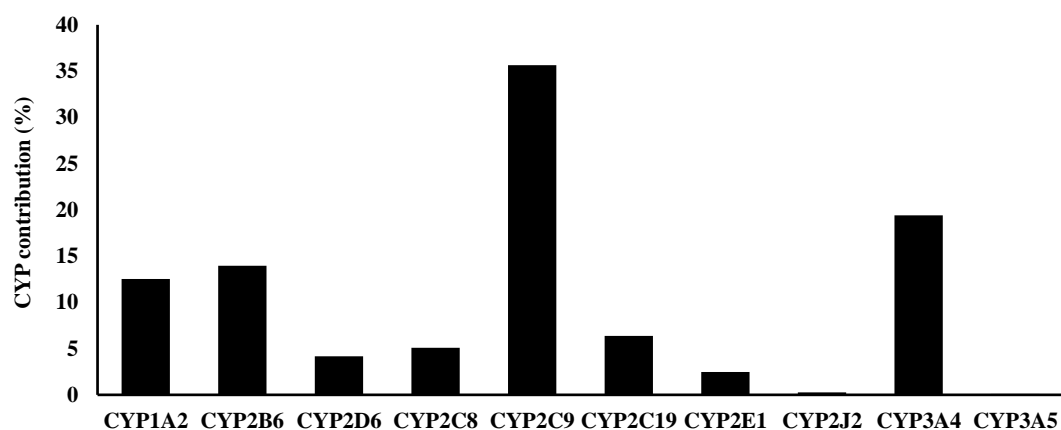


Fig. 44 Estimated CYP contribution by cDNA-expressed CYPs.

3-3-2-3 Nabumetone から M3 への変換に対する化学阻害剤の影響

Nabumetone から M3 への変換に対する各 CYP 分子種の阻害剤の影響について検討した (Fig. 45). 今回用いた阻害剤 (Table 13 再掲) のなかで nabumetone から M3 への変換を顕著に低下させるものは無かった. 一般的に, ヒト肝ミクロソーム中で複数の酵素分子種が関与する同一の代謝反応では, 化学阻害剤を用いた代謝実験では, 一つの CYP 分子種がある程度の相対的寄与率を持っていないと代謝酵素の特定が難しいとされている.

Table 13 Inhibitors used in the inhibition studies. (p. 82 再掲)

Inhibitor	Concentration (μ M)	Enzyme
Furafylline* (FUR)	0.1	CYP1A2
α -Naphthoflavone (α -NF)	1	CYP1A2
Ticlopidine* (TICP)	0.1	CYP2B6
Montelukast (MK)	0.03	CYP2C8
Sulfaphenazole (SFZ)	10	CYP2C9
(S)-(+)-N-3-Benzylrivanol (N-BN)	1	CYP2C19
S-Mephenytoin (S-MF)	50	CYP2C19
Quinidine (QUIN)	0.1	CYP2D6
Diethyldithiocarbamate* (DETC)	10	CYP2E1
Ketoconazole (KCZ)	1	CYP3A4
Troleandomycin* (TAM)	50	CYP3A4

* : metabolism-dependent inhibitor

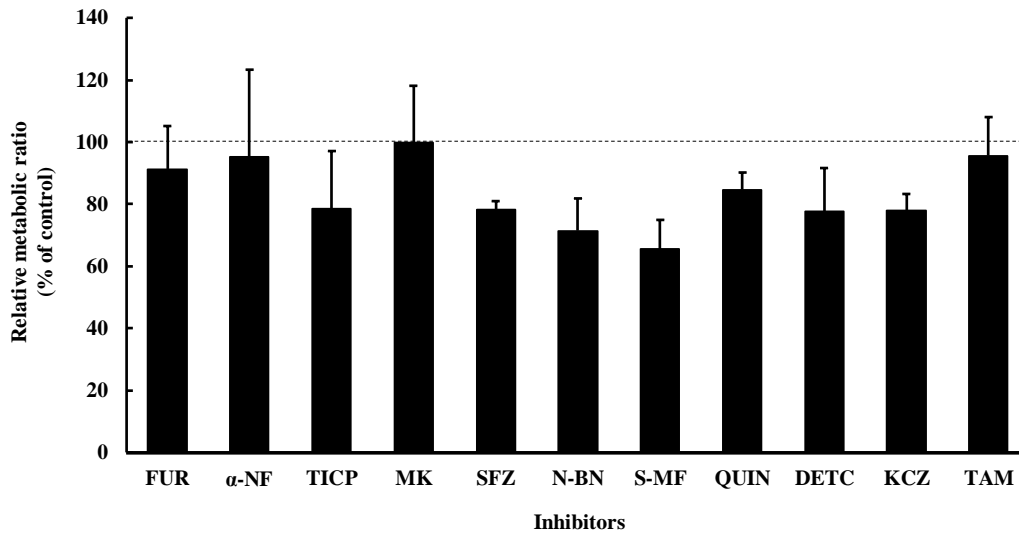


Fig. 45 Effect of enzyme inhibitors on M3 formation from nabumetone in human microsomes.
Each bar represents the mean \pm S.D. (n=3).

3-3-2-4 Nabumetone から M3 への変換に対する阻害抗体の影響

ヒト CYP 発現系マイクロソームを用いた代謝実験の結果から、nabumetone から M3 の生成に関与していると推定された 5 つの CYP 分子種 (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 および CYP3A4) について、抗体を用いて阻害実験を行った (Fig. 46). ヒト肝マイクロソーム 100 μ g に対して 20 μ L の抗体を添加したときに、CYP2C9 抗体では M3 の生成を約 57.1%阻害した. CYP2C19 抗体, CYP1A2 抗体, CYP3A4 抗体および CYP2B6 抗体ではそれぞれ 45.4%, 34.0%, 17.5%および 7.4%の阻害が観察された. 抗体を用いた阻害実験の結果から、阻害曲線を作成することで、最大阻害率から CYP 分子種の相対寄与率を推定することが可能である. 阻害抗体を用いた阻害実験の結果より、nabumetone から M3 の変換には、複数の酵素が関与しており、特に CYP2C9 が約 60%と最も関与している可能性が示唆された.

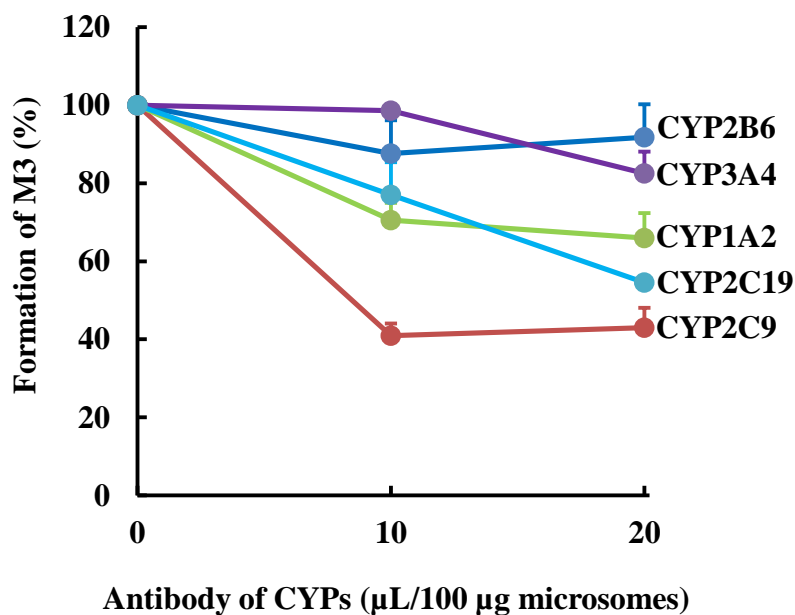


Fig. 46 The effects of antibody of CYPs on the M3 formation from nabumetone in human liver microsomes.

Each point represents the mean \pm S.D. (n = 3).

3-3-2-5 Silensomes™を用いた nabumetone から M3 への変換に関与する各 CYP 分子種の寄与率の検討

Silensomes™はプールドヒト肝ミクロソームと mechanism based inhibitor (MBI) をインキュベーションした後、遊離の MBI を除去して調製された特定の CYP 分子種の活性が抑制された (80% 以上) ミクロソームである [112-115]。Silensomes™を用いて nabumetone から M3 への変換に関与する各 CYP 分子種の寄与率の検討した。

5 つの CYP 分子種 (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 および CYP2C19) の Silensomes™を用いて nabumetone から M3 への変換に関与する各 CYP 分子種の寄与率を求めた (Fig. 47)。CYP2C9 の寄与率が最も大きく 54.0%であり、次いで CYP1A2 (33.4%), CYP2B6 (7.6%), CYP2C19 (12.2%), CYP3A4 (8.8%) の順であった。

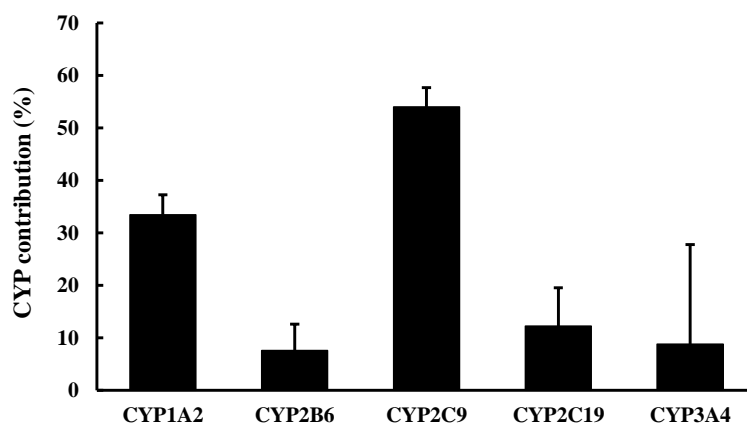


Fig. 47 Estimated CYP contribution by Silensomes™.

Each point represents the mean \pm S.D. (n = 3).

発現系マイクロソームを用いて算出した CYP の寄与率，阻害抗体を用いて算出した CYP の寄与率および Silensomes™を用いて算出した CYP の寄与率を Table 16 にまとめた．3 つの実験方法で求めた寄与率は，CYP2C9 が最も大きいという点においては一致していた．また，阻害抗体と Silensomes™を用いて算出した寄与率は，CYP2C19 を除いて似た傾向を示した．

CYP 発現系マイクロソームは，自然には存在しない酵素であり，CYP と酵素化学的に同一であっても CYP タンパク質が過剰に発現している可能性がある．また，電子伝達系酵素（NADPH-cytochrome P450 reductase, cytochrome-*b5*），酵素周辺の環境や膜脂質組成はヒト肝細胞とは異なっており，ヒト肝マイクロソームでの活性と必ずしも一致するとは限らない [61-65, 107]．そのため，CYP 発現系を用いた代謝実験の結果は何らかの補正が必要となる．補正する方法には，ヒト肝マイクロソームにおける CYP 分子種の含量に基づく補正方法と relative activity factor (RAF) を用いて補正する方法が提唱されている [45, 108-111]．CYP 分子種の含量に基づく補正方法は，CYP 発現系で求めた活性値にヒト肝マイクロソーム中の各 CYP 分子種の発現量を乗じる方法であるが，ヒト肝マイクロソームにおける各 CYP 分子種含量に大きな変動があるために正確に寄与率を求めるには注意が必要である．RAF はある CYP 分子種に特異的な代謝反応の CYP 発現系による代謝活性とヒト肝マイクロソームによる代謝活性との比である．しかし，同一の CYP 分子種により代謝されるいくつかのプローブ基質について，RAF が常に一定であるかどうかはまだ確認されていない．RAF を用いて寄与率を算出する場合は，事前に CYP 分子種に特異的な代謝反応のプローブ基質を用いて，CYP 発現系マイクロソームおよびヒト肝マイクロソームで活性を測定し RAF を求めなくてはならないため，手間がかかる．一方，CYP 分子種同定において，阻害抗体を用いる方法は最も有用な方法であると報告されている [107]．しかし，CYP 分子種同定における有用性は使用する阻害抗体の交差反応性に依存する．そこで，従来の CYP 発現系マイクロソームや阻害抗体から寄与率を求める際の欠点を補うために，CYP の寄与率を求めるツールとして Silensomes™が開発された．Silensomes™は，従来の方法と比べて主要なヒト CYP の *in vivo* における寄与を正確に予測することを可能であり，簡単に寄与率を求めることができるとされている．

今回、阻害抗体と Silensomes™を用いて算出した寄与率は、CYP2C19 を除けば似た傾向を示した。使用した CYP2C19 の阻害抗体は polyclonal 抗体であり、データシートに CYP2C8 および 2C9 に対して交差反応性を示すことが記されていた。Silensomes™と比較して阻害抗体で CYP2C19 の寄与率が高かったのは、阻害抗体の交差反応性により CYP2C19 の寄与率を高く見積もっている可能性が考えられた。

Table 16 Estimated CYP contribution.

CYP	CYP Contribution (%)		
	cDNA-expressed CYPs	Antibody	Silensomes™
1A2	12.5	34.0	33.4
2B6	14.0	7.4	7.6
2C9	35.6	57.1	54.0
2C19	6.4	45.4	12.2
3A4	19.4	17.5	8.8

第4節 小括

Nabumetone から MNBO への NADPH 依存的な還元代謝は、阻害実験と相関実験の結果から、ヒト肝ミクロソームでは、 11β -HSD によって代謝されることが明らかになった。ヒト肝サイトゾル中では、AKR1C サブファミリーの複数の酵素が還元代謝に関与し、特に AKR1C4 は nabumetone の還元代謝において主要な役割を果たしていることが明らかになった。CBR についても nabumetone から MNBO の生成にある程度関与していると推察した。

Nabumetone から M3 への変換は、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 分子種が関与しており、CYP2C9 の寄与率が最も高いことが明らかになった。

総括

非ステロイド性抗炎症薬 nabumetone は、1980 年代後半から臨床で使用されているが、その代謝特性については様々な異なる結果が報告されており、詳細は解明されていない。本研究では、プロドラッグである nabumetone の活性化、不活化および非活性化経路に関わる酸化、還元、抱合などの複数の代謝反応を触媒する複数の代謝酵素の代謝特性を種々酵素源、種々条件の *in vitro* 代謝実験により詳細に評価し、以下の知見を得た (Fig. 48)。

第 1 章では、nabumetone から活性代謝物 6-MNA への変換について検討した。

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* 代謝実験でのみ観察されたことから、補酵素の異なる複数の酵素の関与が示唆された。種々酵素源を用いて 2 段階インキュベーションを行い検討したところ、nabumetone はまずヒト肝ミクロソーム画分に存在するフラビン含有モノオキシゲナーゼ 5 (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 alcohol dehydrogenase (ADH) によりアルデヒド体となった後に、aldehyde dehydrogenase (ALDH) により 6-MNA になることが判明した。Nabumetone からエステル体への生成を、Baeyer-Villiger monooxygenase (BVMO) の基質である 4-methoxyphenylacetone (4-MP-one) が低減したことから、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。

また、nabumetone から 6-MNA への変換には、nabumetone の 3-水酸化体 (3-OH-NAB) を経由する経路も存在し、3-OH-NAB が FMO5 によりエステル体となり、加水分解されてアルデヒド体となり、次いで ALDH により 6-MNA となることを明らかにした。一般にアルデヒド体は安定性が低く、検出が困難なことが多いが、本章ではアルデヒド捕獲剤の methoxyamine および HPLC 用アルデヒドラベル化試薬 DBD-H を用いる 2 つの方法で、アルデヒド体の存在を確認することができた。

第 2 章では、活性代謝物 6-MNA の不活化代謝について検討した。

6-MNA から 6-HNA への不活化には、CYP2C の関与が判明した。さらにこの不活性化代謝には種差が存在し、ヒトでは CYP2C9 が、ラットでは CYP2C6 および CYP2C11 が不活化を担う酵素分子種であることを明らかにした。6-MNA 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、ヒトとラット間で V_{max}/K_m 値に著しい差は観察されなかった。

第 3 章では、nabumetone の非活性化代謝について検討した。

Nabumetone の非活性化代謝は、炭素鎖中のケトンが 2 級アルコールに還元され 4-(6-methoxynaphthalen-2-yl)butan-2-ol (MNBO) となる経路と 6-methoxy 基が *O*-脱メチル化されて 4-(6-hydroxy-2-naphthyl)butan-2-one (M3) になる経路の 2 つが存在する。

Nabumetone から MNBO の還元代謝は、ヒト肝ミクロソーム中では 11β -hydroxysteroid dehydrogenase (11β -HSD) が触媒することを明らかにした。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

が示唆された。

Nabumetone から M3 への *O*-脱メチル化には複数の CYP が関与し、なかでも CYP2C9 が最も寄与率が高いことが示唆された。

以上より、nabumetone の代謝の複数の経路と複数の酵素の関与の詳細が判明した。Nabumetone の代謝には、CYP 以外の複数の代謝酵素 (non-CYP) が関与していることが明らかになった。特にプロドラッグである nabumetone の活性化にヒト 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のは新たな知見である。

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考えられる。

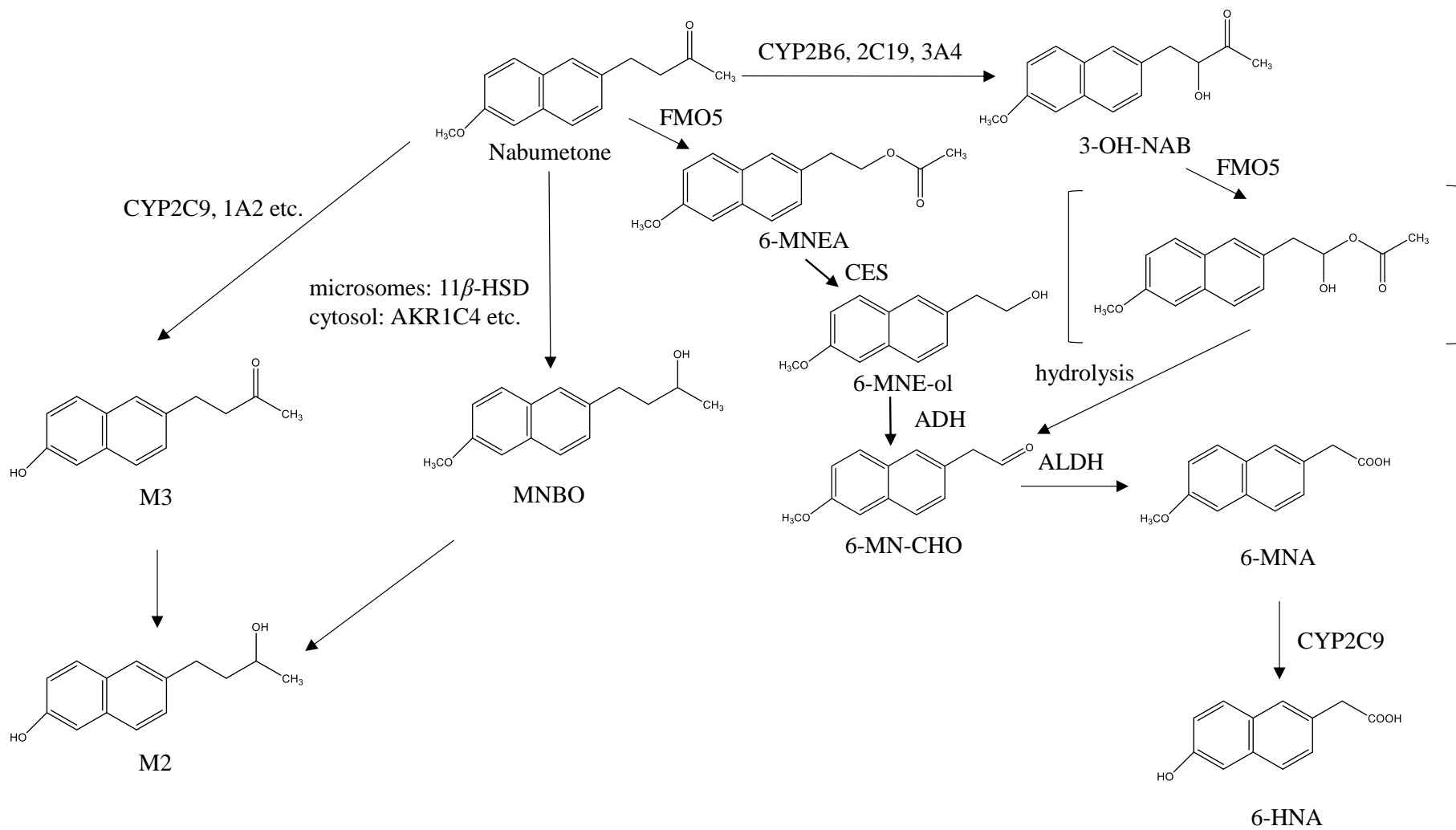


Fig. 48 Proposed metabolic pathways of nabumetone in human.

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行および論文作成に終始ご指導いただきました城西国際大学薬学部薬物動態学研究室 秋元雅之教授に謹んで謝意を表します。また、有益なご助言とご支援をいただきました城西国際大学薬学部薬物動態学研究室 長谷川哲也教授に感謝申し上げます。

本論文の主査として、ご審査賜りました城西国際大学薬学部臨床栄養学研究室 太田篤胤教授に深謝いたします。本論文の副査として、ご審査賜りました城西国際大学薬学部薬理学研究室 田嶋公人准教授に深謝いたします。

また、代謝物の合成および本研究に対しご助言いただきました城西国際大学薬学部生物有機化学研究室 亀井智代助教に心より感謝の意を表します。代謝物の化学構造に関して化学的側面からの示唆に富んだご助言をいただきました城西国際大学薬学部生物有機化学研究室 高橋たみ子前教授ならびに小柳順一教授に謝意を表します。

さらに、本研究の遂行にあたり種々のご協力をいただきました大原厚祐博士、武井千弥博士ならびに城西国際大学薬学部の皆様に深く御礼申し上げます。

最後に、城西国際大学 杉林堅次学長には、終始ご助言と激励を賜りました。あらためて感謝申し上げます。

参考文献

1. 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).
2. 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).
3. Periti P., Mazzei T., Mini E., Novelli A., Pharmacokinetic drug interactions of macrolides. *Clin. Pharmacokinet.*, **23**, 106-131 (1992).
4. Ajayi F. O., Sun H., Perry J., Adverse drug reactions: a review of relevant factors. *J. Clin. Pharmacol.*, **40**, 1093-1101 (2000).
5. Lasser K. E., Allen P. D., Woolhandler S. J., Himmelstein D. U., Wolfe S. M., Bor D. H., Timing of new black box warnings and withdrawals for prescription medications. *JAMA*, **287**, 2215-2220 (2002).
6. 山田 泰弘, 実験方法シリーズ:代謝に関与するCYP 分子種同定, *Drug Metab. Pharmacokinet. NL*, **22**, 6-23 (2007).
7. 「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン(最終案)の公表について」, 平成 26 年 7 月 8 日, 厚生労働省医薬食品局審査管理課事務連絡.
8. Argikar U. A., Potter P. M., Hutzler J. M., Marathe P. H., Challenges and Opportunities with Non-CYP Enzymes Aldehyde Oxidase, Carboxylesterase, and UDP-Glucuronosyltransferase: Focus on Reaction Phenotyping and Prediction of Human Clearance. *AAPS J.*, **18**, 1391-1405 (2016).
9. Cerny M. A., Prevalence of Non-Cytochrome P450-Mediated Metabolism in Food and Drug Administration-Approved Oral and Intravenous Drugs: 2006-2015, *Drug Metab. Dispos.*, **44**, 1246-1252 (2016).
10. Okuda H., Nishiyama T., Ogura K., Nagayama S., Ikeda K., Yamaguchi S., Nakamura Y., Kawaguchi Y., Watabe T., Lethal drug interactions of sorivudine, a new antiviral drug, with oral 5-fluorouracil prodrugs, *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 270-273 (1997).
11. Diasio R. B., Sorivudine and 5-fluorouracil; a clinically significant drug-drug interaction due to inhibition of dihydropyrimidine dehydrogenase, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **46**, 1-4 (1998).
12. 渡部 烈, 西山 貴仁, 小倉 健一郎, ソリブジンの薬害の発生メカニズムと教訓, *薬物動態*, **15**, 265-274 (2000).
13. Zhang X., Liu H. H., Weller P., Zheng M., Tao W., Wang J., Liao G., Monshouwer M., Peltz G., In silico and in vitro pharmacogenetics: aldehyde oxidase rapidly metabolizes a p38 kinase inhibitor, *Pharmacogenomics J.*, **11**, 15-24 (2011).
14. Sanoh S., Nozaki K., Murai H., Terashita S., Teramura T., Ohta S., Prediction of human metabolism of FK3453 by aldehyde oxidase using chimeric mice transplanted with human or rat hepatocytes, *Drug Metab. Dispos.*, **40**, 76-82 (2012).
15. 藤津隆, 佐藤幸夫, 越智武洋, 広井純, 友井正明, 岡本正則, 下村恭一, 向阪正信, ナブメソンの抗炎症, 鎮痛・解熱作用. *基礎と臨床*, **24**, 5187-5210 (1990).

16. 寺川 雅人, 桑原 徳康, 土屋 為弘, 石橋 光治, 野口 英世, 東 純一, 澤村 昭彦, 栗本 哲哉, Nabumetone 単回および連続経口投与時のヒトでの体内動態, *薬物動態*, **3**, 407-416 (1988).
17. 後明郁男, がん疼痛治療における NSAIDs の意義と選択一オピオイド単独療法ではなぜ不十分か一, *治療*, **87**, 896-899 (2005).
18. 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).
19. 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).
20. 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).
21. Nobilis M., Mikušek J., Szotáková B., Jirásko R., Holčapek 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).
22. 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).
23. Lee C. A., Neul D., Clouser-Roche A., Dalvie D., Wester M. R., Jiang Y., Jones J. P. 3rd, Freiwald S., Zientek M., Totah R. A., Identification of novel substrates for human cytochrome P450 2J2, *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 347-356 (2010).
24. Mikami E., Goto T., Ohno T., Matsumoto H., Nishida M., Simultaneous analysis of naproxen, nabumetone and its major metabolite 6-methoxy-2-naphthylacetic acid in pharmaceuticals and human urine by high-performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **23**, 917-925 (2000).
25. Bjornsson T. D., Callaghan J. T., Einolf H. J., Fischer V., Gan L., Grimm S., Kao J., King S. P., Miwa G., Ni L., Kumar G., McLeod J., Obach S. R., Roberts S., Roe A., Shah A., Snikeris F., Sullivan J. T., Tweedie D., Vega J. M., Walsh J., Wrighton S. A., The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a PhRMA perspective, *J. Clin. Pharmacol.*, **43**, 443-469 (2003).
26. Rodríguez C., de Gonzalo G., Torres Pazmiño D. E., Fraaije M. W., Gotor V., Baeyer-Villiger monooxygenase-catalyzed kinetic resolution of racemic α -alkyl benzyl ketones: enzymatic synthesis of α -alkyl benzylketones and α -alkyl benzylesters, *Tetrahedron: Asymmetry*, **20**, 1168-1173(2009).
27. Fiorentini F., Geier M., Binda C., Winkler M., Faber K., Hall M., Mattevi A., Biocatalytic Characterization of Human FMO5: Unearthing Baeyer-Villiger Reactions in Humans, *ACS Chem. Biol.*, **11**, 1039-1048 (2016).
28. Lai W. G., Farah N., Moniz G. A., Wong Y. N., A Baeyer-Villiger oxidation specifically catalyzed by human flavin-containing monooxygenase 5, *Drug Metab. Dispos.*, **39**, 61-70 (2011).
29. Diao X., Deng P., Xie C., Li X., Zhong D., Zhang Y., Chen X., Metabolism and pharmacokinetics of 3-n-butylphthalide (NBP) in humans: the role of cytochrome P450s and alcohol dehydrogenase in biotransformation, *Drug Metab. Dispos.*, **41**, 430-444 (2013).

30. Inoue K., Mizuo H., Kawaguchi S., Fukuda K., Kusano K., Yoshimura T., Oxidative metabolic pathway of lenvatinib mediated by aldehyde oxidase, *Drug Metab. Dispos.*, **42**, 1326-1333 (2014).
31. Holm N. B., Noble C., Linnet K., JWH-018 ω -OH, a shared hydroxy metabolite of the two synthetic cannabinoids JWH-018 and AM-2201, undergoes oxidation by alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase enzymes in vitro forming the carboxylic acid metabolite, *Toxicol. Lett.*, **259**, 35-43 (2016).
32. Mao Z., Wu Y., Li Q., Wang X., Liu Y., Di X., Aldehyde oxidase-dependent species difference in hepatic metabolism of fasudil to hydroxyfasudil, *Xenobiotica*, **48**, 170-177 (2018).
33. Martin S., Lenz E. M., Smith R., Temesi D. G., Orton A. L., Clench M. R., Methanol adducts leading to the identification of a reactive aldehyde metabolite of CPAQOP in human liver microsomes by ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **31**, 145-151 (2017).
34. Uzu S., Kanda S., Imai K., Nakashima K., Akiyama S., Fluorogenic reagents: 4-aminosulphonyl-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole, 4-(N,N-dimethylaminosulphonyl)-7-hydrazino-2,1,3-benzoxadiazole and 4-hydrazino-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole hydrazine for aldehydes and ketones, *Analyst*, **115**, 1477-1482 (1990).
35. Dentan C., Tselepis A. D., Chapman M. J., Ninio E., Pefabloc, 4-[2-aminoethyl]benzenesulfonyl fluoride, is a new, potent nontoxic and irreversible inhibitor of PAF-degrading acetylhydrolase, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1299**, 353-357 (1996).
36. Diatchuk V., Lotan O., Koshkin V., Wikstroem P., Pick E., Inhibition of NADPH oxidase activation by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds, *J. Biol. Chem.*, **272**, 13292-13301 (1997).
37. Carpenter K. L., Dennis I. F., Challis I. R., Osborn D. P., Macphee C. H., Leake D. S., Arends M. J., Mitchinson M. J., Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 diminishes the death-inducing effects of oxidised LDL on human monocyte-macrophages, *FEBS Lett.*, **505**, 357-363 (2001).
38. Watanabe A., Fukami T., Nakajima M., Takamiya M., Aoki Y., Yokoi T., Human arylacetamide deacetylase is a principal enzyme in flutamide hydrolysis, *Drug Metab. Dispos.*, **37**, 1513-1520 (2009).
39. Nakajima A., Fukami T., Kobayashi Y., Watanabe A., Nakajima M., Yokoi T., Human arylacetamide deacetylase is responsible for deacetylation of rifamycins: rifampicin, rifabutin, and rifapentine, *Biochem. Pharmacol.*, **82**, 1747-1756 (2011).
40. Kim M. J., Jeong E. S., Park J. S., Lee S. J., Ghim J. L., Choi C. S., Shin J. G., Kim D. H., Multiple cytochrome P450 isoforms are involved in the generation of a pharmacologically active thiol metabolite, whereas paraoxonase 1 and carboxylesterase 1 catalyze the formation of a thiol metabolite isomer from ticlopidine, *Drug Metab. Dispos.* **42**, 141-152 (2014).
41. Shimizu M., Fukami T., Ito Y., Kurokawa T., Kariya M., Nakajima M., Yokoi T., Indiplon is hydrolyzed by arylacetamide deacetylase in human liver, *Drug Metab. Dispos.*, **42**, 751-758 (2014).
42. Oda S., Fukami T., Yokoi T., Nakajima M., A comprehensive review of UDP-glucuronosyltransferase and esterases for drug development, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **30**, 30-51 (2015).

43. Albertí J., Martinet A., Sentellas S., Salvà M., Identification of the human enzymes responsible for the enzymatic hydrolysis of aclidinium bromide, *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 1202-1210 (2010).
44. Kobylińska K., Barlińska M., Kobylińska M., Analysis of nabumetone in human plasma by HPLC. Application to single dose pharmacokinetic studies, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **32**, 323-328 (2003).
45. Rodrigues A. D., 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 (1999).
46. Newton D. J., Wang R. W., Lu A. Y., Cytochrome P450 inhibitors. Evaluation of specificities in the in vitro metabolism of therapeutic agents by human liver microsomes, *Drug Metab. Dispos.*, **23**, 154-158 (1995).
47. Rodrigues A. D., Roberts E. M., Mulford D. J., Yao Y., Ouellet D., Oxidative metabolism of clarithromycin in the presence of human liver microsomes. Major role for the cytochrome P4503A (CYP3A) subfamily, *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 623-630 (1997).
48. Suzuki A., Iida I., Tanaka F., Akimoto M., Fukushima K., Tani M., Ishizaki T., Chiba K., Identification of human cytochrome P-450 isoforms involved in metabolism of R(+)- and S(-)-gallopamil: utility of in vitro disappearance rate, *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 1254-1259 (1999).
49. Bourrié M., Meunier V., Berger Y., Fabre G., Cytochrome P450 isoform inhibitors as a tool for the investigation of metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **277**, 321-332 (1996).
50. Suzuki H., Kneller M. B., Haining R. L., Trager W. F., Rettie A. E., (+)-N-3-Benzyl-nirvanol and (-)-N-3-benzyl-phenobarbital: new potent and selective in vitro inhibitors of CYP2C19, *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 235-239 (2002).
51. Levine M., Law E. Y., Bandiera S. M., Chang T. K., Bellward G. D., In vivo cimetidine inhibits hepatic CYP2C6 and CYP2C11 but not CYP1A1 in adult male rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284**, 493-499 (1998).
52. Szakács T., Veres Z., Vereczkey L., Effect of phenobarbital and spironolactone treatment on the oxidative metabolism of antipyrine by rat liver microsomes, *Pol. J. Pharmacol.*, **53**, 11-19 (2001).
53. Hummel M. A., Dickmann L. J., Rettie A. E., Haining R. L., Tracy T. S., Differential activation of CYP2C9 variants by dapsone, *Biochem. Pharmacol.*, **67**, 1831-1841 (2004).
54. Iwakawa S., Miyashita K., Hashimoto Y., Kuroda T., Effect of glimepiride and glibenclamide on S-warfarin 7-hydroxylation by human liver microsomes, recombinant human CYP2C9.1 and CYP2C9.3, *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1983-1985 (2006).
55. Rodrigues A. D., Roberts E. M., The in vitro interaction of dexmedetomidine with human liver microsomal cytochrome P4502D6 (CYP2D6), *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 651-655 (1997).
56. Leemann T., Transon C., Dayer P., Cytochrome P450TB (CYP2C): a major monooxygenase catalyzing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver, *Life Sci.*, **52**, 29-34 (1993).
57. Yamaori S., Takami K., Shiozawa A., Sakuyama K., Matsuzawa N., Ohmori S., In vitro inhibition of CYP2C9-mediated warfarin 7-hydroxylation by iguratimod: possible mechanism of iguratimod-

- warfarin interaction, *Biol. Pharm. Bull.*, **38**, 441-447 (2015).
58. Nakajima M., Kobayashi K., Shimada N., Tokudome S., Yamamoto T., Kuroiwa Y., Involvement of CYP1A2 in mexiletine metabolism, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **46**, 55-62 (1998).
 59. Yoshii K., Kobayashi K., Tsumuji M., Tani M., Shimada N., Chiba K., Identification of human cytochrome P450 isoforms involved in the 7-hydroxylation of chlorpromazine by human liver microsomes, *Life Sci.*, **67**, 175-184 (2000).
 60. Akimoto M., Iida I., Itoga H., Miyata A., Kawahara S., Kohno Y., The in vitro metabolism of desglymidodrine, an active metabolite of prodrug midodrine by human liver microsomes, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **29**, 179-186 (2004).
 61. Remmel R. P., Burchell B., Validation and use of cloned, expressed human drug-metabolizing enzymes in heterologous cells for analysis of drug metabolism and drug-drug interactions, *Biochem. Pharmacol.* **46**, 559-566 (1993).
 62. Crespi C. L., Penman B. W., Use of cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes to study potential drug-drug interactions, *Adv. Pharmacol.*, **43**, 171-188 (1997).
 63. Tracy T. S., Marra C., Wrighton S. A., Gonzalez F. J., Korzekwa K.R., Involvement of multiple cytochrome P450 isoforms in naproxen O-demethylation, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **52**, 293-298 (1997).
 64. Yamazaki H., Nakajima M., Nakamura M., Asahi S., Shimada N., Gillam E. M., Guengerich F. P., Shimada T., Yokoi T., Enhancement of cytochrome P-450 3A4 catalytic activities by cytochrome b(5) in bacterial membranes, *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 999-1004 (1999).
 65. McGinness D. F., Griffin S. J., Moody G. C., Voice M., Hanlon S., Friedberg T., Riley R. J., Rapid characterization of the major drug-metabolizing human hepatic cytochrome P-450 enzymes expressed in *Escherichia coli*, *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 1017-1023 (1999).
 66. Grothusen A., Hardt J., Bräutigam L., Lang D., Böcker R., A convenient method to discriminate between cytochrome P450 enzymes and flavin-containing monooxygenases in human liver microsomes, *Arch. Toxicol.*, **71**, 64-71 (1996).
 67. Mani C., Hodgson E., Kupfer D., Metabolism of the antimammary cancer antiestrogenic agent tamoxifen. II. Flavin-containing monooxygenase-mediated N-oxidation, *Drug Metab. Dispos.*, **21**, 657-661 (1993).
 68. Guo Z., Raeissi S., White R. B., Stevens J. C., Orphenadrine and methimazole inhibit multiple cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes, *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 390-393 (1997).
 69. Eagling V.A., Tjia J.F., Back D.J., Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **45**, 107-114 (1998).
 70. Bogaards J. J. P., Bertrand M., Jackson P., Oudshoorn M. J., Weaver R. J., van Bladeren P. J., Walther B., Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man, *Xenobiotica*, **30**, 1131-1152 (2000).
 71. Guengerich, F. P., Dannan, G. A., Wright, S. T., Martin, M. V., Kaminsky, L. S., Purification and characterization of liver microsomal cytochromes p-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with

- phenobarbital or beta-naphthoflavone, *Biochemistry*, **21**, 6019-6030 (1982).
72. Nedelcheva V., Gut I., P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer, *Xenobiotica*, **24**, 1151–1175 (1994).
 73. Imaoka S., Yamada T., Hiroi T., Hayashi K., Sakaki T., Yabusaki Y., Funae Y., Multiple forms of human P450 expressed in *Saccharomyces cerevisiae* systematic characterization and comparison with those of the rat, *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 1041–1050 (1996).
 74. Imaoka S., Terano Y., Funae Y., Changes in the amount of cytochrome P450s in rat hepatic microsomes with starvation, *Arch. Biochem. Biophys.*, **278**, 168-178 (1990).
 75. Hanatani T., Fukuda T., Onishi S., Funae Y., Azuma J., No major difference in inhibitory susceptibility between CYP2C9.1 and CYP2C9.3, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **59**, 233-235 (2003).
 76. Iida I., Miyata A., Arai M., Hirota M., Akimoto M., Higuchi S., Kobayashi K., Chiba K., Catalytic roles of CYP2C9 and its variants (CYP2C9*2 and CYP2C9*3) in lornoxicam 5'-hydroxylation, *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 7-9 (2004).
 77. Sullivan-Klose T. H., Ghanayem B. I., Bell D. A., Zhang Z. Y., Kaminsky L. S., Shenfield G. M., Miners J. O., Birkett D. J., Goldstein J. A., The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism, *Pharmacogenetics*, **6**, 341-349 (1996).
 78. Miners J. O., Coulter S., Birkett D. J., Goldstein J.A., Torsemide metabolism by CYP2C9 variants and other human CYP2C subfamily enzymes, *Pharmacogenetics*, **10**, 267-270 (2000).
 79. Rettie A. E., Wienkers L. C., Gonzalez F. J., Trager W. F., Korzekwa K. R., Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9, *Pharmacogenetics*, **4**, 39-42 (1994).
 80. Nasu K., Kubota T., Ishizaki T., Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in a Japanese population, *Pharmacogenetics*, **7**, 405-409 (1997).
 81. Crespi C. L., Miller V. P., The R144C change in the CYP2C9*2 allele alters interaction of the cytochrome P450 with NADPH: cytochrome P450 oxidoreductase, *Pharmacogenetics*, **7**, 203-210 (1997).
 82. Iwatsubo T., Hirota N., Ooie T., Suzuki H., Shimada N., Chiba K., Ishizaki T., Green C. E., Tyson C. A., Sugiyama Y., Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. *Pharmacol. Ther.*, **73**, 147-171 (1997).
 83. Skarydova L., Nobilis M., Wsól V., Role of carbonyl reducing enzymes in the phase I biotransformation of the non-steroidal anti-inflammatory drug nabumetone in vitro, *Xenobiotica*, **43**, 346-354 (2013).
 84. Ohtani I., Kusumi T., Kashman Y., Kakisawa H., High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4092-4096 (1991).
 85. Hara A., Taniguchi H., Nakayama T., Sawada H., Purification and properties of multiple forms of dihydrodiol dehydrogenase from human liver, *J. Biochem.*, **108**, 250-254 (1990).
 86. Deyashiki Y., Taniguchi H., Amano T., Nakayama T., Hara A., Sawada H., Structural and functional comparison of two human liver dihydrodiol dehydrogenases associated with 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity, *Biochem. J.*, **282**, 741-746 (1992).
 87. Grothusen A., Hardt J., Bräutigam L., Lang D., Böcker R., A convenient method to discriminate

- between cytochrome P450 enzymes and flavin-containing monooxygenases in human liver microsomes, *Arch. Toxicol.*, **71**, 64-71 (1996).
88. Atalla A., Breyer-Pfaff U., Maser E., Purification and characterization of oxidoreductases-catalyzing carbonyl reduction of the tobacco-specific nitrosamine 4-methylnitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human liver cytosol, *Xenobiotica*, **30**, 755-769 (2000).
 89. Diederich S., Grossmann C., Hanke B., Quinkler M., Herrmann M., Bähr V., Oelkers W., In the search for specific inhibitors of human 11 β -hydroxysteroid-dehydrogenases (11 β -HSDs): chenodeoxycholic acid selectively inhibits 11 β -HSD-I, *Eur. J. Endocrinol.*, **142**, 200-207 (2000).
 90. Maser E., Stinner B., Atalla A., Carbonyl reduction of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) by cytosolic enzymes in human liver and lung, *Cancer Lett.*, **148**, 134-144 (2000).
 91. Atalla A., Maser E., Characterization of enzymes participating in carbonyl reduction of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human placenta, *Chem. Biol. Interact.*, **130-132**, 737-748 (2001).
 92. Higaki Y., Usami N., Shintani S., Ishikura S. El-Kabbani O., Hara A., Selective and potent inhibitors of human 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C1) that metabolizes neurosteroids derived from progesterone, *Chem. Biol. Interact.*, **143-144**, 503-513 (2003).
 93. Maser E., Friebertshäuser J., Völker B., Purification, characterization and NNK carbonyl reductase activities of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 from human liver: enzyme cooperativity and significance in the detoxification of a tobacco-derived carcinogen, *Chem. Biol. Interact.*, **143-144**, 435-448 (2003).
 94. Tani N., Yabuki M., Komuro S., Kanamaru H., Characterization of the enzymes involved in the in vitro metabolism of amrubicin hydrochloride, *Xenobiotica*, **35**, 1121-1133 (2005).
 95. Steckelbroeck S., Oyesanmi B., Jin Y., Lee S. H., Kloosterboer H. J., Penning T. M., Tibolone metabolism in human liver is catalyzed by 3 α /3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities of the four isoforms of the aldo-keto reductase (AKR)1C subfamily, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **316**, 1300-1309 (2006).
 96. Barski O. A., Tipparaju S. M., Bhatnagar A., The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification, *Drug Metab. Rev.*, **40**, 553-624 (2008).
 97. Lee S. K., Kim J. H., Seo Y. M., Kim H. C., Kang M. J., Jeong H. G., Lee E. S., Jeong T. C., In vitro characterization of the enzymes involved in the metabolism of 1-furan-2-yl-3-pyridin-2-yl-propenone, an anti-inflammatory propenone compound, *Arch. Pharm. Res.*, **31**, 764-770 (2008).
 98. Blech S., Ludwig-Schwellinger E., Gräfe-Mody E. U., Withopf B., Wagner K., The metabolism and disposition of the oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, linagliptin, in humans, *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 667-678 (2010).
 99. Tong Z., Chandrasekaran A., Li H., Rotshteyn Y., Erve J. C., Demaio W., Talaat R., Hultin T., Scatina J., In vitro metabolism and identification of human enzymes involved in the metabolism of methylalntrexone, *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 801-807 (2010).
 100. Imamura Y., Shimada H., Strain- and sex-related differences of carbonyl reductase activities in kidney

- microsomes and cytosol of rats, *J. Appl. Toxicol.*, **24**, 437-441 (2004).
101. Ohara H., Miyabe Y., Deyashiki Y., Matsuura K., Hara A., Reduction of drug ketones by dihydrodiol dehydrogenases, carbonyl reductase and aldehyde reductase of human liver, *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 221-227 (1995).
 102. Cho U. S., Park E. Y., Dong M. S., Park B. S., Kim K., Kim K.H., Tight-binding inhibition by alpha-naphthoflavone of human cytochrome P450 1A2, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1648**, 195-202 (2003).
 103. Walsky R. L., Gaman E. A., Obach R. S., Examination of 209 drugs for inhibition of cytochrome P450 2C8, *J. Clin. Pharmacol.*, **45**, 68-78 (2005).
 104. Walsky R. L., Obach R. S., A comparison of 2-phenyl-2-(1-piperidinyl)propane (ppp), 1,1',1''-phosphinothiolyldynetrizaziridine (thioTEPA), clopidogrel, and ticlopidine as selective inactivators of human cytochrome P450 2B6, *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 2053-2059 (2007).
 105. Piwowarska J., Wrzosek M., Radziwoń-Zaleska M., Ryszewska-Pokraśniewicz B., Skalski M., Matsumoto H., Biernacka-Bazyłuk A., Szelenberger W., Pachecka J., Serum cortisol concentration in patients with major depression after treatment with clomipramine, *Pharmacol. Rep.*, **61**, 604-611 (2009).
 106. 高岸 靖, 佐藤 耕治, 富田 敬三, 坂元 照, 高速液体クロマトグラフ法による血中の Acetohexamide およびその代謝物 Hydroxyhexamide の定量, *薬学雑誌*, **99**, 961-963 (1979).
 107. Lu A. Y., Wang R. W., Lin J. H., Cytochrome P450 in vitro reaction phenotyping: a re-evaluation of approaches used for P450 isoform identification, *Drug Metab. Dispos.*, **31**, 345-350 (2003).
 108. Crespi C. L., "Xenobiotic-metabolizing human cells as tools for pharmacological and toxicological research", *Advances in Drug Research* (26th ed.) ed. by B. Testa, U.A. Meyer, Academic Press, London, 1995, pp. 179-235.
 109. Crespi C. L., Penman B. W., Use of cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes to study potential drug-drug interactions, *Adv. Pharmacol.*, **43**, 171-188 (1997).
 110. Iwatsubo T., Suzuki H., Shimada N., Chiba K., Ishizaki T., Green C. E., Tyson C. A., Yokoi T., Kamataki T., Sugiyama Y., Prediction of in vivo hepatic metabolic clearance of YM796 from in vitro data by use of human liver microsomes and recombinant P-450 isozymes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, 909-919 (1997).
 111. Venkatakrisnan K., von Moltke L. L., Court M. H., Harmatz J. S., Crespi C. L., Greenblatt D. J., Comparison between cytochrome P450 (CYP) content and relative activity approaches to scaling from cDNA-expressed CYPs to human liver microsomes: ratios of accessory proteins as sources of discrepancies between the approaches, *Drug Metab. Dispos.*, **28**, 1493-1504 (2000).
 112. Parmentier Y., Pothier C., Delmas A., Caradec F., Trancart M. M., Guillet F., Bouaita B., Chesne C., Brian Houston J., Walther B., Direct and quantitative evaluation of the human CYP3A4 contribution (fm) to drug clearance using the in vitro SILENSOMES model, *Xenobiotica*, **47**, 562-575 (2017).
 113. Jones B. C., Markandu R., Gu C., Scarfe G., CYP-Mediated Sulfoximine Deimination of AZD6738, *Drug Metab. Dispos.*, **45**, 1133-1138 (2017).
 114. Zabela V., Hettich T., Schlotterbeck G., Wimmer L., Mihovilovic M. D., Guillet F., Bouaita B., Shevchenko B., Hamburger M., Oufir M., GABA_A receptor activity modulating piperine analogs: In

- vitro metabolic stability, metabolite identification, CYP450 reaction phenotyping, and protein binding, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1072**, 379-389 (2018).
115. Parmentier Y., Pothier C., Hewitt N., Vincent L., Caradec F., Liu J., Lin F., Trancart M. M., Guillet F., Bouaita B., Chesne C., Walther B., Direct and quantitative evaluation of the major human CYP contribution (fmCYP) to drug clearance using the in vitro Silensomes™ model, *Xenobiotica*, **49**, 22-35 (2019).
116. Johnson C., Stubbley-Beedham C., Stell J.G., Hydralazine: a potent inhibitor of aldehyde oxidase activity in vitro and in vivo. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 4251-4256 (1985).
117. Takaoka N., et al., Sanoh S., Okuda K., Kotake Y., Sugahara G., Yanagi A., Ishida Y., Tateno C., Tayama Y., Sugihara K., Kitamura S., Kurosaki M., Terao M., Garattini E., Ohta S., Inhibitory effects of drugs on the metabolic activity of mouse and human aldehyde oxidases and influence on drug-drug interactions. *Biochem. Pharmacol.*, **154**, 28-38 (2018).
118. Dalvie D., Di L., Aldehyde oxidase and its role as a drug metabolizing enzyme. *Pharmacol. Ther.*, **201**, 137-180 (2019).

付録 1 LC/MS/MS 分析

実験方法

1-2-3 (nabumetone + hepatocytes, 3-OH-NAB + hepatocytes), 1-2-5 (nabumetone + hFMO5 + S9 (NAD⁺)) および 1-2-7 (3-OH-NAB + hFMO5 + S9 (NAD⁺), 3-OH-NAB + hFMO5 + S9 (NADPH)) の *in vitro* 代謝実験で生成した 6-MNA を LC/MS/MS を用いて以下の測定条件で分析した.

試料

1-2-2 の方法と同様に固相抽出を行い, 固相抽出後の残渣に 10 mmol/L 酢酸アンモニウム/アセトニトリル (75:25, v/v) 混液を 1 mL 加えて 5 分間超音波処理した後, 攪拌して溶液を得た. 溶液の一部を回収し, 遠心分離 (10,000 rpm, 室温, 10 分間) した上清を測定試料に用いた.

機器

HPLC : LC-30AD (Nexera X2) シリーズ (島津製作所)
MS/MS : LCMS-8060 (島津製作所)

測定条件

LC 条件

分析カラム : Inertsil ODS-3 2.1 mm×150 mm, 5 μm
(ジーエルサイエンス, 東京) Lot: 11187524
移動相 A : 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液
移動相 B : アセトニトリル
移動相 B グラジエント条件 :

Time (min)	0.0	8.0	8.3	8.5	10.0
B conc. (%)	25	85	85	25	25

流速 : 0.2 mL / min
注入量 : 10 μL
カラム温度 : 40°C

MS 条件

イオン化法 : エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
マルチプルリアクションモニタリング (MRM) 条件:

化合物	極性	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)
6-MNA	-	215.40	156.30

Q3 スキャン条件: 測定範囲 (m/z) 50.00~500.00, ポジティブ及びネガティブ

結果

6-MNA 標準溶液の MS/MS スペクトルを Fig. 49 に示す. 6-MNA は m/z 215.25 [M-H]⁻ をプリカーサーイオンとして, m/z 156.30 と m/z 171.25 が特徴的なプロダクトイオンとして得られた. 定量には感度が高かった m/z 156.30 を用いた.

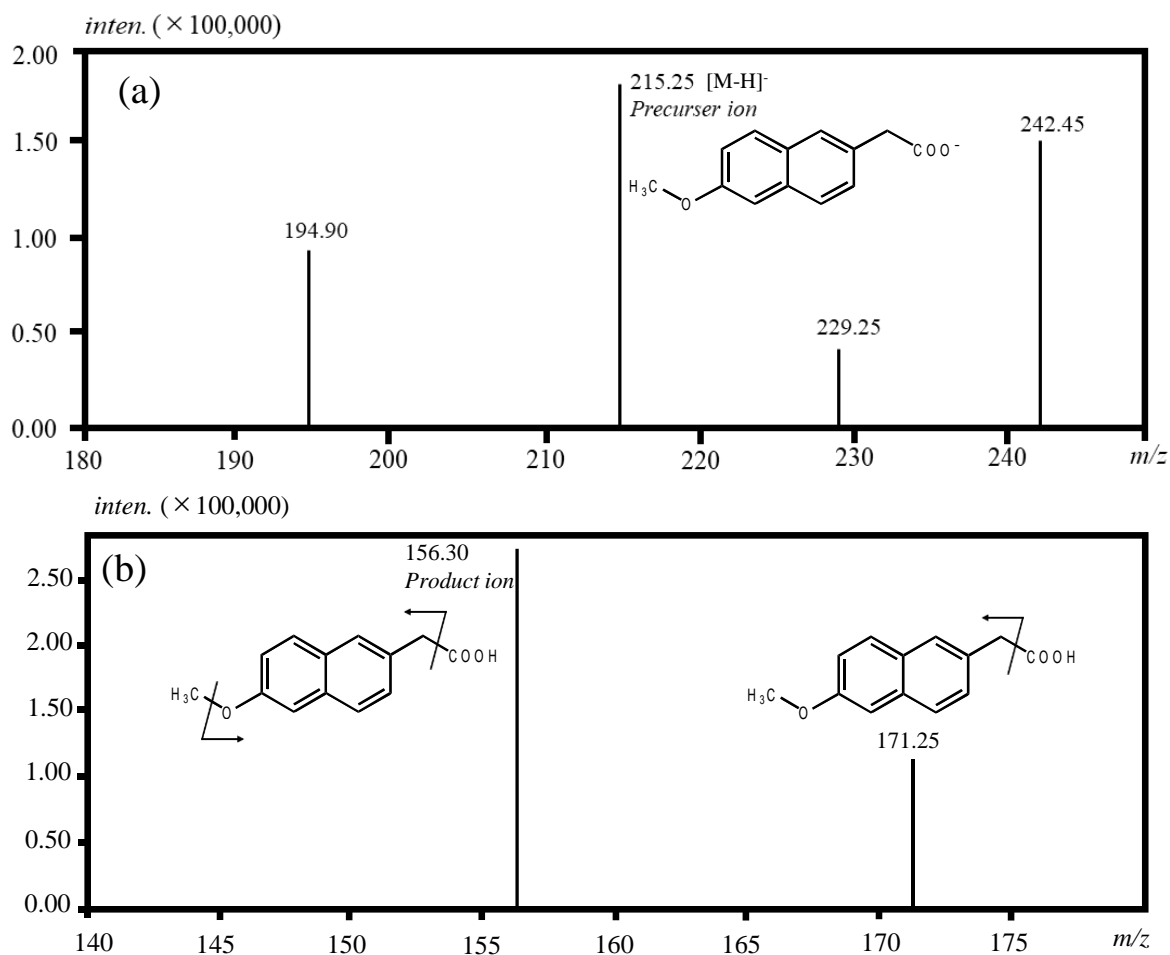


Fig. 49 MS/MS precursor ion scan spectra (a) and product ion scan spectra (b) of 6-MNA.

6-MNA 標準溶液と 1-2-3 (nabumetone + hepatocytes, 3-OH-NAB + hepatocytes), 1-2-5 (nabumetone + hFMO5 + S9 (NAD⁺)) および 1-2-7 (3-OH-NAB + hFMO5 + S9 (NAD⁺), 3-OH-NAB + hFMO5 + S9 (NADPH)) の *in vitro* 代謝実験から得た試料の MRM クロマトグラムを Fig. 50 および Fig. 51 に示す. 全ての試料から 6-MNA が検出された. 3-OH-NAB + hFMO5 + S9 (NAD⁺) では, 3-OH-NAB + hFMO5 + S9 (NADPH) に比べて約 5 倍の 6-MNA の生成が確認できた.

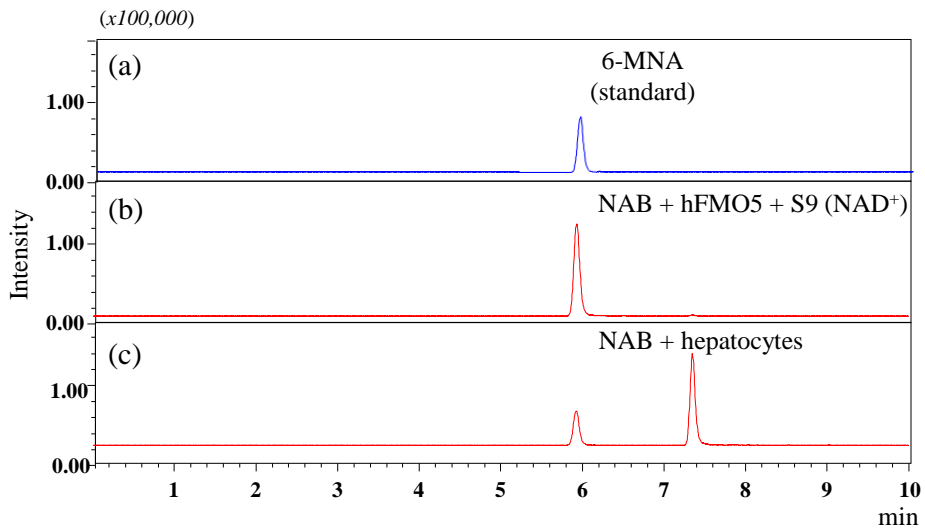


Fig. 50 MRM chromatograms of the standard (a) and samples. Samples obtained from the incubations of cDNA-expressed hFMO5 and human S9 fractions in the presence of NAD⁺ (b) and cryopreserved hepatocytes (c) with nabumetone. The concentration of standard (6-MNA) was 100 ng/mL.

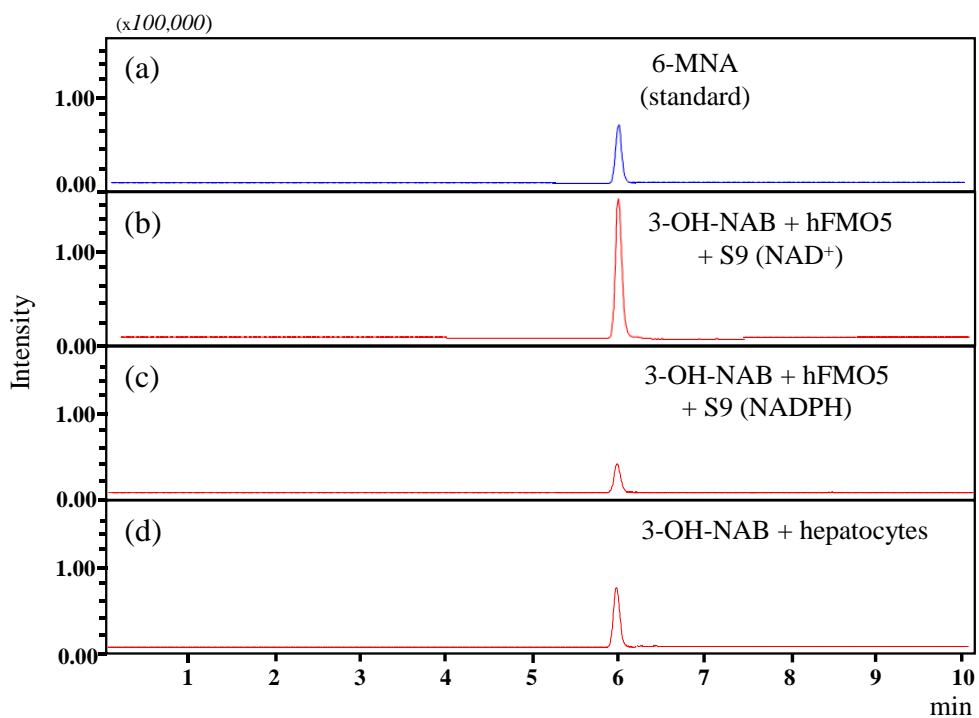


Fig. 51 MRM chromatograms of the standard (a) and samples. Samples obtained from the incubations of cDNA-expressed hFMO5 and human S9 fractions in the presence of NAD⁺ (b) or NADPH (c) and cryopreserved hepatocytes (d) with 3-OH-NAB. The concentration of standard (6-MNA) was 100 ng/mL.

付録 2 ヒト FMO5 発現系ミクロソームで生成した 3-OH-NAB の代謝物とヒト ALDH および AO 発現系サイトゾルを用いた *in vitro* 代謝実験における阻害剤の影響

実験方法

1-2-9 の阻害実験, 新たに阻害剤として hydralazine hydrochloride (HZ; 100 $\mu\text{mol/L}$), isovanillin (IV; 100 $\mu\text{mol/L}$) とアルデヒド体 (6-MN-CHO) の構造類似体である 6-methoxy-2-naphthaldehyde (6-MN; 100 $\mu\text{mol/L}$) [116-118] を加えて再度検討した (Table 17). HZ および 6-MN は東京化成工業より購入した. IV は和光純薬工業より購入した.

Table 17 Inhibitors used in the inhibition studies.

Inhibitor	Concentration (mM)	Enzyme	Enzyme Source	Cofactor
Disulfiram (DF)	1	aldehyde dehydrogenase (ALDH)	microsomes, cytosol	NAD ⁺ , NADP ⁺
Menadione (MD)	0.1	aldehyde oxidase (AO)	cytosol	not required
Raloxifene (RF)	0.01	aldehyde oxidase (AO)	cytosol	not required
Hydralazine hydrochloride (HZ)	0.1	aldehyde oxidase (AO)	cytosol	not required
Isovanillin (IV)	0.1	aldehyde oxidase (AO)	cytosol	not required
6-Methoxy-2-naphthaldehyde (6-MN)	0.1	-	-	-

結果

Table 18 に ALDH および AO 発現系サイトゾルを用いた *in vitro* 代謝実験に Table 17 の阻害剤を添加した結果を示す. AO 発現系サイトゾルを用いた代謝実験 (2nd incubation) の反応液に, 典型的な AO の阻害剤である MD および RF を添加したところ阻害は観られなかった. 一方, AO の不可逆的阻害剤である HZ は弱い阻害効果を示した. また, アルデヒド構造を有する IV および 6-MN では, 6-MNA の生成がコントロール (阻害剤非添加) の 52.4 および 13.1%まで阻害された ($p < 0.001$) (Table 18). AO 阻害剤である MD および RF により阻害が観られなかったものの, AO 阻害剤である IV および HZ, さらにアルデヒド体 (6-MN-CHO) の構造類似体である 6-MN で阻害が観察されたことから, 3-OH-NAB から 6-MNA の生成に AO が関与している可能性が考えられた.

Table 18 Inhibition studies on the formation of 6-MNA from incubation products of 3-OH-NAB by hFMO5 with ALDH or AO.

Inhibitor	Second incubation conditions	% of control ^{a)}
DF	ALDH + NAD⁺	16.4 ± 0.1**
MD	AO	96.5 ± 3.0
RF	AO	99.4 ± 2.9
HZ	AO	73.3 ± 0.6
IV	AO	52.4 ± 7.1**
6-MN	AO	13.1 ± 3.4**

a) Each data represents the mean ± S.D. of triplicate experiments. ** $p < 0.001$, significantly different from no treatment with each inhibitor.

主論文目録

本学位論文内容は、学術雑誌に掲載された下記の論文を基礎とするものである。

1. Matsumoto K., Nemoto E., Hasegawa T., Akimoto M., Sugibayashi K., *In vitro* characterization of the cytochrome P450 isoforms involved in the metabolism of 6-methoxy-2-naphthylacetic acid, an active metabolite of the prodrug nabumetone. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 734-739 (2011).
2. Matsumoto K., Hasegawa T., Kamei T., Koyanagi J., Takahashi T., Akimoto M., Sugibayashi K., Reductive metabolism of nabumetone by human liver microsomal and cytosolic fractions: exploratory prediction using inhibitors and substrates as marker probes. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **40**, 127-35 (2015).
3. Matsumoto K., Hasegawa T., Ohara K., Takei C., Akimoto M., Roles of CYP2C9 and its variants (*CYP2C9*2* and *CYP2C9*3*) in the metabolism of 6-methoxy-2-naphthylacetic acid, an active metabolite of the prodrug nabumetone. *J. Pharm. Investig.*, **50**, 71-79 (2020).
4. Matsumoto K., Hasegawa T., Ohara K., Takei C., Kamei T., Koyanagi J., Takahashi T., Akimoto M., A metabolic pathway for the prodrug nabumetone to the pharmacologically active metabolite, 6-methoxy-2-naphthylacetic acid (6-MNA) by non-cytochrome P450 enzymes. *Xenobiotica* **50**, 783-792 (2020).
5. Matsumoto K., Hasegawa T., Ohara K., Kamei T., Koyanagi J., Akimoto M., Role of human flavin-containing monooxygenase (FMO) 5 in the metabolism of nabumetone: Baeyer-Villiger oxidation in the activation of the intermediate metabolite, 3-hydroxy nabumetone, to the active metabolite, 6-methoxy-2-naphthylacetic acid *in vitro*. *Xenobiotica* **51**, 155-166 (2021).