

氏名	せき ひろゆき 関 博行
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	博士甲第 号
学位授与の日付	2021年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	CYP2C19 遺伝的 variants に対する天然果実成分の阻害特性解析
論文審査委員	(主査) 教授 大谷 寿一 (博士 (薬学)) (副査) 教授 中村 智徳 (博士 (薬学)) 教授 松元 一明 (博士 (薬学))

## 論文内容の要旨

### 【序論】

ヒト cytochrome P450 (CYP) 2C19 は、プロトンポンプ阻害剤や抗血小板薬等、多種多様な薬物の代謝に関わっている临床上重要な薬物代謝酵素の 1 つである。CYP2C19 の肝臓における発現量は肝臓全 CYP 酵素量の約 2% にすぎないが、CYP2C19 が代謝に関与する薬物は市販薬全体の約 10% にものぼる。また CYP2C19 は肝臓のみならず、小腸においても発現しており、その発現量は CYP3A4、CYP2C9 に次いで多い。さらに CYP2C19 は多型性に富んでおり、特に日本人を含むアジア人では活性欠損者が多いことが知られている。CYP2C19 の extensive metabolizers (EMs) と poor metabolizers (PMs) の被験者に対し、lansoprazole と fluvoxamine を併用すると、homozygous EMs では lansoprazole の血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) が単独投与時の 3.8 倍に上昇した一方で、PMs では大きな変化がなかったことが報告されている。このように、CYP2C19 の遺伝子型は、さまざまな薬物の体内動態や薬物間相互作用の程度、さらにはそれらの個人差を考える上で重要である。

临床上問題となる薬物動態学的相互作用のうち CYPs の阻害は最も主要な原因となる。代表的な CYP の阻害様式として、不可逆的に CYP を不活性化する mechanism-based inhibition (MBI) が知られている。MBI は、基質が酵素により代謝されて生成した代謝中間体が、酵素と共有結合し、安定で不活性な複合体を形成するため、酵素は不可逆的に不活性化される。不活性化された CYP が新たな CYP に置き換わるまで酵素活性は減少した状態が続き、相互作用が遷延することから、阻害様式を解析することは臨床的にも重要である。

CYPs に対する MBI は、薬物間相互作用のみならず、飲食物 - 薬物間相互作用の原因ともなる。Resveratrol (RSV) は、ぶどうやピーナッツ等に含まれるフィトアレキシンであり、抗酸化作用をはじめとして多くの生理活性をもつことから、サプリメントとしても使用されるが、これまでに MBI を介して代表的な薬物代謝酵素である

CYP3A4 を不可逆的に阻害することが報告されている。一方、CYP2C19 については、*in vitro* において IC<sub>50</sub> を指標に阻害作用が報告されているものの、阻害特性、すなわち阻害の時間依存性や阻害様式についての詳細な検討はなされていない。

グレープフルーツジュース (GFJ) もまた、CYP3A4 代謝活性に対し MBI 作用を有することが報告されており、主要な阻害成分として、GFJ 中のフラノクマリン類である 6', 7'-dihydroxybergamottin (DHB)、bergamottin (BG) が知られている。一方で、CYP2C19 に対するこれらフラノクマリン類の作用に関する報告は限られている。これまでに、ヒト臨床試験において CYP2C19 により代謝活性化される clopidogrel を GFJ と併用した際に clopidogrel 活性代謝物の AUC が 14% にまで低下することが報告されているものの、阻害成分は確定されておらず、その阻害機序も不明である。一方で、前述の DHB や BG は CYP2C19 に対して阻害作用を有することが *in vitro* において報告 (IC<sub>50</sub> 値: DHB: 3,000 nM、BG: 300 nM) されているが、その時間依存性や阻害様式などの詳細な検討はなされていない。

そこで本研究では、まず、CYP2C19 の代表的基質である omeprazole (OPZ) 代謝に対する RSV、DHB 及び BG の阻害時間依存性およびその様式を詳細に検討し、その阻害特性を明らかにした。次にアミノ酸配列の異なる 5 種の CYP2C19 遺伝的 variants (.1A, .1B, .8, .10, .23) に対する阻害を評価することで、3 成分の阻害特性に対する CYP2C19 アミノ酸変異の影響を明らかにした。

## 第 1 章 野生型 CYP2C19 に対する天然果実成分の阻害特性解析

### 【背景・目的】

これまでに RSV、DHB 及び BG の CYP2C19 に対する阻害の時間依存性や阻害様式について詳細な検討はなされていない。そこで本章ではヒト組み換え CYP2C19 野生型分子 (.1B) を用いて、典型的基質 OPZ の代謝に対する各阻害剤の阻害様式を決定し、その阻害キネティクスを明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

#### 1. MBI 阻害実験

市販の Human CYP2C19BR Bactosomes® を用いて OPZ の 5 位水酸化活性を指標に、各濃度の RSV、DHB、BG による CYP2C19 代謝活性の変化を、阻害剤の事前曝露時間 (preincubation 時間; 0~20 分) を変えて評価した。阻害剤濃度はそれぞれ RSV; 0-100 μM、DHB; 0-3 μM、BG; 0-100 μM を用いた。OPZ の代謝物 5-hydroxy OPZ は HPLC-UV 法により定量した。

#### 2. MBI パラメータの算出

得られた代謝速度の対数値と preincubation 時間との関係から、各阻害剤濃度における酵素の不活性化速度定数 ( $\Delta k_{\text{obs}}$ ) を求め、得られた  $\Delta k_{\text{obs}}$  と阻害剤濃度 (II) の関係に Eq.1 を、非線形最小二乗法を用いてあてはめ、最大不活性化速度定数

( $k_{\text{inact,max}}$ ) および最大不活性化速度の 1/2 の不活性化をもたらす阻害剤の濃度 ( $K_I$ ) を算出した。

$$\Delta k_{\text{obs}} = k_{\text{inact,max}} \cdot [I]/([I] + K_I) \quad (\text{Eq. 1})$$

ただし、BG については  $\Delta k_{\text{obs}}$  の飽和がみられなかったため、線形回帰を行い、その傾きから不活性化パラメータとして  $k_{\text{inact,max}}/K_I$  を算出した。

### 3. 可逆的阻害作用の評価

Preincubation を行わない条件で、反応速度が阻害剤濃度依存的に低下した場合に、阻害剤非添加 (0  $\mu\text{M}$ ) 時に対する残存活性を求めた。続いて、得られた残存活性と阻害剤濃度との関係に、Eq.2 を非線形最小二乗法を用いてあてはめ、 $K_I$  値を算出した。

$$\text{残存活性 (\%)} = 100/\{1 + \exp(\ln C - \ln K_I)\} \quad (\text{Eq. 2})$$

### 4. 静的モデルを用いた阻害強度を指標とした臨床上的影響

定常状態時の阻害剤非存在下に対する阻害剤存在下の活性型酵素の割合を表す酵素活性比 ( $\varepsilon$ ) は時間非依存的阻害と MBI の場合においてそれぞれ Eqs.3, 4 より推定した。

$$\varepsilon = (1 + [I]/K_I)^{-1} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\varepsilon = k_{\text{deg}} / (k_{\text{deg}} + \Delta k_{\text{obs}}) \quad (\text{Eq. 4})$$

$k_{\text{deg}}$  は酵素分解速度定数を表し、文献値 0.000445 ( $\text{min}^{-1}$ ) を用いた。臨床的影響を評価する際の阻害剤濃度としては、RSV は 1 回 30 mg 摂取時、BG および DHB では、GFJ 200 mL 摂取時の小腸内推定濃度を用いた。

#### 【結果・考察】

##### RSV, DHB 及び BG の CYP2C19.1B に対する阻害様式について

RSV 及び DHB では preincubation 時間依存的な CYP2C19 活性の低下がみられ、これら成分は MBI を介して CYP2C19 活性を不活性化することが示唆された (RSV:  $k_{\text{inact,max}} = 0.0482 \text{ min}^{-1}$ 、 $K_I = 3.27 \mu\text{M}$ 、DHB:  $k_{\text{inact,max}} = 0.245 \text{ min}^{-1}$ 、 $K_I = 0.287 \mu\text{M}$ )。

BG は preincubation 時間および濃度依存的に CYP2C19 を不活性化し、この効果には MBI および可逆的阻害の寄与が示唆された ( $K_I = 0.86 \mu\text{M}$ ) が、可逆的阻害により 50% の阻害をもたらす濃度は MBI のものに比べ 26 倍大きいことから、BG による CYP2C19 の阻害も主に MBI であることが示された ( $k_{\text{inact,max}}/K_I = 0.0135 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ )。

RSV 及び GFJ 摂取した際の小腸における各阻害剤成分の濃度から算出された

CYP2C19 の酵素活性比 (e) は RSV, DHB, 及び BG でそれぞれ 0.0092、0.0018-0.0020、0.00044 -0.0031 であったことから、通常の GFJ や RSV を含む食品を摂取することにより小腸 CYP2C19 の 90% 以上が阻害されると考えられた。これらの知見により、臨床においてこれら成分を含む食品を摂取した場合、小腸 CYP2C19 の MBI による薬物飲食物間相互作用を引き起こす可能性があることが示唆された。

## 第 2 章 CYP2C19 変異型分子種に対する天然果実成分の阻害特性解析

### 【目的】

本章では、RSV、DHB、BG の MBI キネティクスに対する CYP2C19 アミノ酸置換を伴う遺伝的変異の影響を明らかにすることを目的に、大腸菌を用いて発現させた各 CYP2C19.1A (none), .1B (I331V), .8 (W120R), .10 (I331V, P227L), .23 (I331V, G91R) を含む膜画分を用いて、OPZ の 5-位水酸化代謝に対する RSV または GFJ 成分 (DHB、BG) の阻害様式を決定し、その阻害キネティクスを定量的に明らかにするとともに、variants 間で比較することを目的とした。

### 【方法】

共同研究者より供与された CYP2C19 各 variants の plasmid を *E.coli* に形質転換し、培養後に膜発現を行った。得られた大腸菌から膜画分を調製した。得られた膜画分を用いて、前章と同様に MBI 実験を行い、パラメータを算出した。さらに RSV ではサプリメントよりも含有量の少ないピーナッツ 10 g を摂取時、DHB では GFJ 1 mL 摂取時に想定される小腸内濃度から Eq.3 により各 CYP2C19 variants の酵素活性比を算出した。

### 【結果・考察】

#### CYP2C19 各 variants に対する RSV, DHB, BG の阻害様式

OPZ-5 位水酸化活性は、いずれの CYP2C19 遺伝的 variants においても、RSV, DHB 及び BG によって preincubation 時間依存的に阻害された。したがって、3 成分による不活性化は MBI によるものであることが示された。一方でいくつかの組合せでは preincubation を行わない条件での阻害が認められた。具体的には、RSV による CYP2C19.1A, .1B また、DHB による全 variants、BG による CYP2C19.23 以外の variants の阻害で可逆的阻害が確認された ( $K_i = 0.102 - 16.8 \mu\text{M}$ )。しかしながら、いずれの成分も、50% の阻害をもたらす濃度は MBI 阻害と比較して可逆的阻害では 12.2–277 倍高かったことから、可逆的阻害の影響は無視できると考えられる。よって、RSV, DHB 及び BG の CYP2C19 に対する阻害は、遺伝子変異の有無にかかわらず、主に MBI によって説明できると考えられた。

## RSV, DHB, BG 阻害キネティクスパラメータの CYP2C19 遺伝的 variants 間の比較

各成分の MBI キネティクスはアミノ酸置換の影響により変動した。RSV では  $k_{\text{inact,max}}$  が最も大きく変動したのは CYP2C19.23 であり (2.24-fold vs .1A)、 $K_I$  が最も大きく変動したのは CYP2C19.10 (0.00925-fold vs .1A)、 $k_{\text{inact,max}}/K_I$  が最も大きく変動したのは CYP2C19.8 であった (134-fold vs .1A)。DHB では  $k_{\text{inact,max}}$  が最も大きく変動したのは CYP2C19.8 であり (1.87-fold vs .1A)、 $K_I$  が最も大きく変動したのは CYP2C19.10 (9.33-fold vs .1A)、 $k_{\text{inact,max}}/K_I$  は CYP2C19.10 で最も大きく変動した (0.128-fold vs .1A)。BG では CYP2C19.23 に対する  $k_{\text{inact,max}}/K_I$  が最も大きく変動した (10.4-fold vs .1A)。また、 $k_{\text{inact,max}}$  の変動は最大で 2.24 倍であるのに対し、 $K_I$  では 0.00925 倍とアミノ酸変異が与える影響は  $K_I$  の方が大きかった。今回検討した variants (CYP2C19.8, .10, .23) のアミノ酸置換部位は全て CYP2C19 における substrate recognition site (SRS) に位置し、基質の認識や親和性に重要な役割を果たしている。したがって、これらのアミノ酸の置換が立体構造に影響し、阻害剤の認識や親和性に影響を与えた可能性が示唆された。

### RSV および DHB 阻害の臨床上的影響の比較

RSV では、ピーナッツ 10 g を摂取した際の  $\epsilon$  は CYP2C19.8 及び .10 でそれぞれ 0.100, 0.158 であり、約 90% の小腸 CYP2C19 の不活性化が予想された。一方で他の分子種 (.1A, .1B, .23) では  $\epsilon$  がそれぞれ 0.919, 0.942, 0.889 であり、10% 程度の活性阻害であった。DHB では、GFJ 1 mL 摂取時の  $\epsilon$  は CYP2C19.10 で 0.611 であったのに対し他の variants では 0.185-0.314 となり、CYP2C19.10 で阻害の減弱が予測された。これは CYP2C19 の遺伝的素因により阻害の影響が異なることを示し、CYP2C19 遺伝的素因が薬物相互作用の個人差の一因となる可能性が示唆された。

### 【総括】

本研究により天然果実成分 RSV, DHB 及び BG は、GFJ および RSV 含有成分を通常量摂取する際に想定される消化管内濃度において、MBI により CYP2C19 代謝活性を強く阻害することが示された。これらの食品は臨床において消化管内の CYP2C19 活性の阻害を介した薬物飲食物間相互作用を引き起こす可能性がある。また、アミノ酸変異を伴う 5 種の CYP2C19 variants (.1A, .1B, .8, .10, .23) のいずれに対しても、同様に MBI により時間依存的に阻害作用を示すことが示された。興味深いことに、その MBI 阻害強度は variants 間で大きく異なっており、CYP2C19 の遺伝子多型が、CYP2C19 の MBI を介した薬物相互作用の個人差の一因になりうる可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

申請者は、臨床上重要な薬物酸化代謝酵素である cytochrome P450 2C19 (CYP2C19) に着目し、これに対する飲食物成分の阻害活性を検討することで、薬物-飲食物間相互作用に関する新規情報の構築を目指した。まず申請者は、野生型 CYP2C19 酵素に対する、グレープフルーツ成分のフラノクマリン類 (bergamottin, 6', 7'-dihydroxybergamottin) およびぶどうやピーナツなどに広く含有される resveratrol の阻害様式及び阻害作用を定量的に検討した。続いて、アミノ酸置換を伴う 5 種の遺伝的 variants 間で、上記 3 種の阻害成分の阻害特性を比較検討した。その結果、いずれの成分も CYP2C19 に対して暴露時間依存的な不可逆的阻害を示すことを見出した。このときの阻害強度は、飲食物を通常量摂取したときに想定される濃度に阻害成分によって、消化管の CYP2C19 活性を十分に阻害する濃度であったが、その阻害強度には variants 間で差異が見られたことから、CYP2C19 の遺伝子型が、CYP2C19 を介した薬物-飲食物間相互作用に個人差をもたらしていることを加えて示した。これらの成果は、CYP2C19 を介した薬物-飲食物間相互作用の回避に重要な情報を提供するとともに、相互作用に個人差をもたらす要因としての遺伝子変異の重要性をも改めて示したものであり、科学的にも臨床的にも重要な知見と判断できる。

申請者は令和 3 年 2 月 24 日に実施された論文審査会において上記の学位論文にかかる研究内容を発表した。続いて、研究の内容や関連知識に関する口頭試問が行われた。申請者は論文の内容および最新の知見に沿って、口頭試問に対して適切に回答した。

以上より、論文の内容ならびに申請者の関連領域における専門知識のいずれの観点においても、申請者は、博士 (薬学) の学位を授与されるにふさわしいと判断された。

## 論文目録

### 【主論文に関する原著論文】

1. Seki H, Akiyoshi T, Imaoka A, Ohtani H. Inhibitory kinetics of fruit components on CYP2C19 activity. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2019;34(3):181-186.