

氏名	コイヌマ カナ 肥沼 佳菜
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	2025年3月10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	柑橘ジャバラ果汁による薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) 阻害活性の検討と新規阻害成分の同定
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 米澤 淳 (博士 (薬学))
慶應義塾大学学位規程第 11 条に基づく審査委員会実施日： 2025年 2月 3日	

論文内容の要旨

[背景]

経口投与された医薬品の一部は、消化管に発現する薬物代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) 3A4 などにより腸代謝を受け全身循環へ移行する。そのため CYP の活性変動は基質薬物の体内動態に影響を与え、その薬効や副作用の変動要因となりうる。

Grapefruit に代表される柑橘類の果汁は、消化管に発現する各種 CYP 分子種の阻害を介して医薬品との間で重大な飲食物-薬物間相互作用 (food-drug interactions; FDI) を引き起こすことがある。Grapefruit およびその類縁柑橘の果汁中の CYP 阻害成分として 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB) および bergamottin (BG) などの furanocoumarins が知られており、これらの成分は *in vitro* において、CYP3A4、CYP2C9 及び CYP2C19 を時間依存的に、また不可逆的に阻害 (mechanism-based inhibition; MBI) することが示されている。一方、BG や DHB 以外にも柑橘類に含まれる flavonoids であるポリメトキシフラボン類の一部が、CYP2C9 や CYP2C19 を阻害することが報告されている。このように、柑橘中の多様な flavonoids などによっても、CYP 阻害を介した FDI が惹起される可能性がある。

日本固有種の柑橘類であるジャバラは、近年、抗炎症、抗アレルギー作用による花粉症症状の緩和を謳うサプリメントなどに汎用されている。一方、ジャバラは各種 flavonoids を含有するものの、上述の代表的 CYP 阻害成分 BG や DHB を含有しないことなどから、CYPs を介した腸代謝阻害に基づく FDI については明らかになっていない。

本研究では、ジャバラ果汁が CYP3A4、CYP2C9 及び CYP2C19 代謝阻害を介した FDI を引き起こすリスクを明らかにすることを目的とした。加えて、阻害が認められた場合には、ジャバラ果汁中の新規の CYP 阻害成分を同定することを目的とした。

【方法】

1. 化合物の抽出・分離精製・構造決定

市販のジャバラ果汁を酢酸エチルで液液抽出して得た抽出物 (JEx) を、silica gel column chromatography 及び分取 HPLC を用いて分離・精製し、CYP3A4 阻害作用を有する候補化合物 2 種を単離した。単離した 2 種の化合物の質量分析及び ^1H NMR スペクトルのデータを既報と比較することで、それぞれ 3,3',4',5,6,7,8-heptamethoxyflavone (HpMF) および 3,3',4',5,6,7-hexamethoxyflavone (HxMF) であることを同定した。

2-1. Recombinant CYP3A4 を用いた MBI 実験と MBI パラメーターの算出

大腸菌発現 recombinant CYP3A4 を用いて testosterone の 6 β 位水酸化活性を指標に各濃度の JEx、HpMF 及び HxMF による CYP3A4 代謝活性の変化を、阻害剤の事前曝露時間 (preincubation 時間; 0-90 分) を変えて評価した。Testosterone の代謝物 6 β -hydroxytestosterone は HPLC-UV 法で定量した。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 (Δk_{obs}) を求め、得られた Δk_{obs} と阻害剤濃度 ($[I]$) の関係に 式 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。

$$\Delta k_{\text{obs}} = k_{\text{inact,max}} \times \frac{[I]}{[I] + K_i} \quad \text{式 1}$$

2-2. Recombinant CYP2C9 を用いた阻害実験

Recombinant CYP2C9 を用いて warfarin の 7 位水酸化活性を指標に、JEx (0-30% 等量) による CYP2C9 に対する時間依存的阻害作用を、阻害剤の preincubation 時間 (0-30 分) を変えて評価した。次に、JEx、HpMF 及び HxMF の時間非依存的阻害作用を評価し、阻害剤非存在下における CYP2C9 活性に対する残存活性を算出することで IC_{50} を得た。Warfarin の代謝物 7-hydroxy warfarin は HPLC-蛍光法により定量した。得られた IC_{50} 値 を式 2 に当てはめ、各成分の阻害定数 (K_i) を算出した。

$$K_i = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad \text{式 2}$$

2-3. Recombinant CYP2C19 を用いた阻害実験

Recombinant CYP2C19 を用いて clopidogrel の 2 位カルボニル化活性を指標に、JEx による CYP2C19 に対する時間依存的阻害作用を、阻害剤の preincubation 時間を変えて評価した。Clopidogrel の代謝物 2-oxo-clopidogrel は LC-MS/MS 法により定量した。

3. HpMF 及び HxMF がジャバラ果汁による CYP3A4 阻害に占める寄与率の推算

JEx の各等量 (1-30%) 濃度による CYP3A4 阻害に占める HpMF 及び HxMF 両成分の阻害の寄与率を、両成分は競合すると仮定し、式 3 から求めた $\Delta k_{\text{obs,HpMF,HxMF}}$ を、式 1 に JEx の阻害キネティクスパラメータを代入して算出した $\Delta k_{\text{obs,JEx}}$ で除するこ

とにより推定した。各等量濃度に希釈された JEx 中の HpMF 及び HxMF 濃度は、HPLC-UV 法で定量した値を用いて推定した。

$$\Delta k_{obs}([I_{HpMF}, HxMF]) = \frac{k_{inact,max,HpMF} \times [I_{HpMF}]}{K_{I,HpMF} \left(1 + \frac{[I_{HxMF}]}{K_{I,HxMF}}\right) + [I_{HpMF}]} + \frac{k_{inact,max,HxMF} \times [I_{HxMF}]}{K_{I,HxMF} \left(1 + \frac{[I_{HpMF}]}{K_{I,HpMF}}\right) + [I_{HxMF}]} \quad \text{式 3}$$

4. 臨床上的の影響の推定

4-1. CYP3A4 阻害の影響

JEx による CYP3A4 の MBI 阻害時の残存活性 (ε) を式 4 より求めた。 k_{deg} は小腸 CYP3A4 の酵素分解速度定数 (0.0005 min^{-1}) を表す。消化管における JEx 濃度 $[I]$ は、ジャバラ果汁を 10 mL 摂取し、小腸内液量 210 mL により 22 倍希釈されると仮定して算出した。

$$\varepsilon (\%) = \frac{k_{deg}}{k_{deg} + \Delta k_{obs}([I])} \times 100 \quad \text{式 4}$$

4-2. CYP2C9 阻害の影響

JEx による CYP2C9 阻害に占める HpMF および HxMF の寄与率を、JEx 中の HpMF および HxMF による CYP2C9 代謝に対する阻害率 ($100 - \text{残存活性} (\varepsilon) (\%)$) を JEx による CYP2C9 代謝に対する阻害率で除することにより算出した。ジャバラ果汁を 10 mL 摂取時の CYP2C9 の残存活性 (ε) は式 5 より求めた。JEx 中の HpMF および HxMF 濃度は、HPLC-UV 法により定量した値を用いた。

$$\varepsilon (\%) = \frac{100}{1 + \sum \frac{[I]}{K_i}} \quad \text{式 5}$$

【結果・考察】

1. CYP3A4 に対する影響

JEx、HpMF 及び HxMF はいずれも CYP3A4 活性を preincubation 時間依存的に阻害した。このことから、ジャバラ果汁は MBI 作用により CYP3A4 を阻害することが明らかとなり、その阻害には HpMF および HxMF が関与することが示された。これら 2 成分はジャバラ果汁による CYP3A4 阻害の約 63–73% に寄与すると推定された。また、ジャバラ果汁 10 mL 摂取時の小腸 CYP3A4 の残存活性 (ε) は 7.22% と推算された。以上より、臨床において、ジャバラ果汁および HpMF や HxMF を含有する飲食物摂取は小腸 CYP3A4 の阻害による FDI を惹起する可能性が示唆された。

2. CYP2C9 に対する影響

JEx は CYP2C9 に対する preincubation 時間依存的な阻害は示さなかった一方で、時間非依存的な阻害作用を示した。また、HpMF 及び HxMF はいずれも CYP2C9 を濃度依存的に阻害し、その阻害強度は HxMF よりも HpMF で高かった。JEx による

CYP2C9 阻害に対する HpMF または HxMF 単独の阻害寄与率はそれぞれ 59.7%、4.8% と推定された。また、HpMF 及び HxMF 両成分の阻害寄与率 (和) は 61.3% と推定されたことから、ジャバラ果汁による CYP2C9 阻害の大部分にはこれら 2 成分が関与すると考えられた。また、ジャバラ果汁 10 mL 摂取時の CYP2C9 の残存活性 (ϵ) は 26.5% と推定され、ジャバラ果汁が小腸 CYP2C9 阻害を介した FDI を引き起こすリスクは低いと考えられた。

3. CYP2C19 に対する影響

JE_x は CYP2C19 活性に対する時間依存的な阻害作用を示さなかった。一方、preincubation 時間 0 min においては、30% 等量 (incubation 中は 3% 等量) の JE_x 存在下における CYP2C19 の代謝速度は、JE_x 非存在下と比較して約 20% 低かった。また、ジャバラ果汁 10 mL 摂取時の CYP2C19 の残存活性は 80% 前後と推算され、ジャバラ果汁が CYP2C19 阻害を介した FDI を引き起こす可能性は低いと考えられた。

【総括】

本研究では柑橘果汁による CYPs 活性阻害が引き起こす FDI について、既知の CYPs 阻害成分である BG 及び DHB を含まないジャバラ果汁に着目し、その CYPs 阻害活性評価及びその阻害活性の要因となる成分の探索を行った。その結果、JE_x は CYP3A4 を濃度及び時間依存的に阻害し、ジャバラ果汁が CYP3A4 に対し MBI 作用を有することをはじめて明らかにした。さらに、ジャバラ果汁から単離した HpMF 及び HxMF の CYP3A4 に対する MBI 作用を検証し、ジャバラ果汁による CYP3A4 阻害に寄与する主要な成分として同定した。また、臨床においてジャバラ果汁及び HpMF や HxMF を含有する飲食物の摂取により CYP3A4 の阻害を介した FDI が惹起される可能性を示した。さらに、CYP2C9 に対する JE_x、HpMF 及び HxMF について、CYP3A4 に対する阻害特性とは異なり、JE_x は CYP2C9 に対する時間依存的な阻害作用を示さない一方、CYP2C9 を時間非依存的に阻害することを明らかにした。また、HpMF 及び HxMF は CYP2C9 に対する時間非依存的な阻害作用を示したことから、これらはジャバラ果汁による CYP2C9 阻害に関与する主要な成分と考えられた。また、臨床においてジャバラ果汁が小腸 CYP2C9 阻害を介した FDI を引き起こすリスクは低いと考えられた。最後に CYP2C19 に対する JE_x の阻害特性を検討した結果、ジャバラ果汁の CYP2C19 に対する阻害は時間非依存的かつ軽微であり、臨床上的影響はほとんどないと推定された。以上、本研究により、CYP3A4 及び CYP2C9 基質薬物との相互作用を引き起こす飲食物として新たにジャバラ果汁が見出された。また、HpMF 及び HxMF が CYP3A4 及び CYP2C9 に対する阻害作用を示すことを明らかにした。本研究で明らかになった HpMF 及び HxMF の阻害キネティクスは、これらを含む天然物と CYP3A4 及び CYP2C9 基質薬物との FDI リスク評価にも応用可能であり、CYPs 基質薬物と飲食物との相互作用による有害事象の回避の一助となることが期待される。

論文審査結果の要旨

申請者は、飲食物薬物間相互作用として、日本固有種であるジャバラの果汁に着目し、消化管において各種薬物の初回通過効果を担う代表的な CYP 分子種である CYP3A4、CYP2C9 及び CYP2C19 に対する阻害特性解析を行うとともに、CYP 阻害活性を有する新規物質の同定を試みた。まず申請者は、大腸菌発現 recombinant CYP3A4 の代謝活性に対するジャバラ果汁酢酸エチル抽出物 (JEx) の影響を評価し、その時間依存的な阻害作用を見出すと共に、その阻害を担う主要成分として、3,3',4',5,6,7,8-heptamethoxyflavone (HpMF) 及び 3,3',4',5,6,7-hexamethoxyflavone (HxMF) を同定した。加えて、本検討から得られた各阻害キネティクスパラメータを用いて、臨床上の相互作用リスクを推定し、ジャバラ果汁の摂取は CYP3A4 基質薬物との間において臨床上重要な相互作用を惹起する可能性を提起した。続いて、申請者は、CYP2C9 活性に対する JEx、HpMF 及び HxMF の影響を評価し、CYP3A4 に対する作用とは異なり、時間非依存的な阻害作用を有することを見出した。このとき、ジャバラ果汁の摂取は、CYP2C9 活性に対する影響は限定的であることを示した。最後に、CYP2C19 に対する影響について検討し、ジャバラ果汁の摂取は CYP2C19 活性に臨床上影響を与えないことを見出した。

この成果は、臨床上重要な新規の飲食物薬物間相互作用を明らかにすると共に、その阻害活性成分の同定は、同成分を含有する他の飲食物の相互作用推定に重要な情報を提供する有用な知見であると判断できる。

令和 7 年 2 月 3 日に実施された審査委員会において、申請者はまず、上記の学位論文にかかる研究内容を口頭発表し、その後、副査 2 名による口頭試問が行われた。

中村教授からは、今回同定した阻害物質の収率とそこから計算する阻害寄与率の妥当性について問われ、申請者は阻害実験時の 100% 等量換算方法を示しつつ適切に回答した。また、CYP2C9 に対する阻害機序として、不可逆的な阻害活性の寄与について問われ、申請者は、*in vitro* 実験方法の詳細を説明することで適切に回答した。さらに、ジャバラ果汁摂取の *in vivo* での影響について問われ、申請者は、本研究結果が *in vitro* 実験結果のみに基づくことの研究の限界に言及しつつ、臨床使用される薬剤の薬物動態学的特性を解説することで適切に回答した。最後に、各 CYP の代謝物定量法および阻害実験時の阻害剤溶解性についての詳細な質問がなされ、申請者は、予備検討結果を提示しつつ適切に回答した。

米澤教授からは、臨床上の相互作用において、可逆的阻害と時間依存的阻害作用の違いの意義について質問がなされ、申請者は、CYP 酵素の合成速度などを示して回答した。これに付随して、時間依存的阻害作用が臨床上で何日程度影響が持続するのか質問がなされた。これについて、申請者は、おおよその影響について回答したものの、より正確に回答できるよう発表資料の予備スライドとして修正準備することとなった。さらに、incubation

中に進行する MBI 作用の影響について質問がなされた。これについても、申請者は incubation 時の阻害剤濃度の詳細をおおむね適切に説明したが、より詳細を明示できるよう、発表資料の予備スライドとしてきちんと対応することとなった。さらに、今回のジャバラ果汁摂取量 10 mL が臨床上の相互作用リスクを評価する上での位置づけを問われ、申請者は、実臨床におけるジャバラ果汁の摂取状況を説明するとともに、摂取量の変動した場合の相互作用リスクについても適切に回答した。また、本研究で用いている相互作用リスク評価方法は、通常は、医薬品を錠剤などとして服用する場合を想定していることが指摘され、本法を果汁摂取時の評価に適応する妥当性が指摘された。これについて申請者は、本邦および米国における飲食物薬物間相互作用リスク評価法の現状を説明するとともに、本法を応用することの研究の限界として回答した。さらに、HpMF 及び HxMF についての基礎的情報に関する質問がなされ、申請者はフラボノイド骨格の構造的特徴や他の柑橘類での含有量について回答した。最後に、申請者の発表時の態度について、明瞭な発言、適切な発表速度、回答時の姿勢などを改善するよう指摘がなされた。

以上より審査委員会は、申請者の研究は博士（薬学）の学位に相当する内容を含むと考えたが、申請者に対して、関連知識のさらなる深耕、語句修正などを含むスライドの適切な修正、予備スライド等を求めるとともに、公聴会へ向け、十分な発表練習を行うことを求めることとした。

以上の審査委員会における指摘事項を踏まえて、申請者は論文及び口頭発表資料の修正を行なった。続けて申請者は、令和 7 年 2 月 18 日に実施された学位論文公聴会において、論文の内容を発表した。

発表後、研究科委員より、実臨床におけるジャバラ果汁による相互作用の程度や影響を受ける期間、ジャバラ果汁による阻害機序の CYP 分子間の違い、本相互作用を受けると考えられる具体的な基質薬、今回見出した阻害成分の消化管吸収率などについて質問がなされ、申請者はいずれも適切に回答した。

以上の過程を通して、学位論文には科学的に新規かつ独創的な内容を含んでいること、申請者は専門領域および関連領域における十分な知識を有していることが確認されたことから、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する。

論文目録

Koinuma K, Noto K, Morita T, Uekusa Y, Kikuchi H, Shimoji M, Seki H, Yamazaki H, Guengerich FP, Nakamura K, Yamamoto K, Imaoka A, Akiyoshi T, Ohtani H. Kinetics of the Inhibition of CYP3A4 and CYP2C19 Activity by Jabara Juice and Identification of the Responsible Inhibitory Components. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Oct 30: S0022-3549(24)00487-8. doi: 10.1016/j.xphs.2024.10.037.