

博士学位論文要約 2024 年度

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

慶應義塾大学大学院薬学研究科

肥沼 佳菜

論文内容の要約

【序論】

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。消化管に発現する CYP のうち、3A4 は 82%、CYP2C9 は 14%、CYP2C19 は 2% を占め、それぞれ felodipine, warfarin, omeprazole など临床上重要な薬剤を基質とする。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る。

Grapefruit などの柑橘果汁は、消化管に発現する各種 CYP 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。実際、felodipine などの CYP3A4 基質薬の血中濃度は数倍に上昇する。

Grapefruit およびその類縁柑橘の果汁中の CYP 阻害成分として furanocoumarins の 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB) および bergamottin (BG) が知られており、これらの成分は *in vitro* において、CYP3A4、CYP2C9 および 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 以外にも柑橘中 flavonoids である 3',4',5,6,7-pentamethoxyflavone (sinensetin) が CYP3A4 を、5,7-dihydroxy-3',4',6-trimethoxyflavone (eupatilin) および 4',5,7-trihydroxy-3',6-dimethoxyflavone (jaceosidin) が CYP2C9 および CYP2C19 をそれぞれ阻害することが報告されており、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目的として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、既知の CYP 阻害成分である 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相互作用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 および 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。

第一章：CYP3A4 に対するジャバラ果汁の阻害特性解析

【背景・目的】

Grapefruit に代表される柑橘果汁は、CYP3A4 阻害を介した FDI を引き起こすことが知られている。臨床において、CYP3A4 基質薬 felodipine の血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は、grapefruit または seville orange の果汁と共に服用すると、水で服用した場合と比較してそれぞれ 2.9 倍、1.8 倍に増加したことが報告されている。柑橘果汁による CYP3A4 阻害を介した FDI は主に BG および DHB により引き起こされると考えられてきたが、柑橘中 flavonoids である sinensetin が CYP3A4 を阻害することなどが示されており、BG および DHB 以外の成分によっても CYP3A4 活性が阻害される可能性がある。

本章は、BG および DHB を含まない柑橘ジャバラの果汁による CYP3A4 阻害特性の解析およびジャバラ果汁中の新規の CYP3A4 阻害成分の同定を目的とした。

【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を、silica gel column chromatography および分取 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および 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. Recombinant CYP3A4 を用いた時間依存的阻害実験

Recombinant CYP3A4 を用いて testosterone の 6β 位水酸化活性を指標に、各濃度のジャバラ果汁酢酸エチル抽出物 (JEx)、HpMF および 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。阻害剤濃度はそれぞれ JEx; 0-30% 等量、HpMF; 0-300 μM、HxMF; 0-500 μM を用いた。Testosterone の代謝物 6β-hydroxytestosterone は HPLC-UV 法により定量した。

3. 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 (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 ($k_{inact,max}$) 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。

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

4. HpMF および 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 および 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 (2) 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当てはめることで算出した $\Delta k_{\text{obs, JEx}}$ 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 および HxMF 濃度は、HPLC-UV 法で定量した値を用いて推定した。

$$\Delta k_{\text{obs}}([I_{\text{HpMF, HxMF}}]) = \frac{k_{\text{inact, max, HpMF}} \times [I_{\text{HpMF}}]}{K_{\text{I, HpMF}}(1 + \frac{[I_{\text{HxMF}}]}{K_{\text{I, HxMF}}}) + [I_{\text{HpMF}}]} + \frac{k_{\text{inact, max, HxMF}} \times [I_{\text{HxMF}}]}{K_{\text{I, HxMF}}(1 + \frac{[I_{\text{HpMF}}]}{K_{\text{I, HpMF}}}) + [I_{\text{HxMF}}]} \quad \text{式 2}$$

5. 臨床上の影響の推定

JEx による CYP3A4 の MBI 阻害時の残存活性 (ϵ) (阻害剤非曝露下に対する阻害剤曝露下における CYP3A4 の活性比) を式 (3) 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。

$$\epsilon (\%) = \frac{k_{\text{deg}}}{k_{\text{deg}} + \Delta k_{\text{obs}}([I])} \times 100 \quad \text{式 3}$$

【結果・考察】

JEx、HpMF および HxMF はいずれも CYP3A4 活性を preincubation 時間依存的に阻害した (JEx: $k_{\text{inact, max}} = 0.0125 \text{ min}^{-1}$ 、 $K_{\text{I}} = 4.25\%$ 等量、HpMF: $k_{\text{inact, max}} = 0.00856 \text{ min}^{-1}$ 、 $K_{\text{I}} = 10.0 \text{ }\mu\text{M}$ 、HxMF: $k_{\text{inact, max}} = 0.0134 \text{ min}^{-1}$ 、 $K_{\text{I}} = 7.90 \text{ }\mu\text{M}$)。このことから、ジャバラ果汁は MBI 作用により CYP3A4 を阻害することが示唆された。また、その阻害成分として HpMF および HxMF が同定され、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、ジャバラ果汁を 10 mL 摂取したと仮定したときの小腸における CYP3A4 の残存活性 (ϵ) は 7.22% と算出された。以上より、臨床において、ジャバラ果汁および HpMF や HxMF を含有する飲食物の摂取により小腸 CYP3A4 の阻害による FDI が惹起される可能性が示唆された。

第二章：CYP2C9 に対するジャバラ果汁の阻害特性解析

【背景・目的】

CYP2C9 は、抗凝固薬 warfarin などの临床上重要な薬物の代謝を担う。他方、grapefruit や pomelo 果汁は、CYP2C9 代謝活性を阻害することで、基質薬と FDI を引き起こす可能性が示唆されている。この CYP2C9 阻害成分として BG および DHB が同定されており、これらが柑橘果汁による CYP2C9 阻害に寄与する主な成分と考えられてきた。一方で、柑橘中の一部の flavonoids は CYP2C9 阻害活性を有することが報告されており、BG および DHB 以外の成分によっても CYP2C9 阻害を介した FDI

が惹起される可能性がある。本章は、CYP2C9 に対するジャバラ果汁、HpMF および HxMF の阻害特性評価を目的とした。

【方法】

1. Recombinant CYP2C9 を用いた時間依存的および時間非依存的阻害実験

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 (0–30% 等量)、HpMF (0–100 μM) および HxMF (0–100 μM) 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 IC₅₀ を得た。Warfarin の代謝物 7-hydroxywarfarin は HPLC-蛍光法により定量した。得られた IC₅₀ 値を式 (4) に当てはめ、各成分の阻害定数 (K_i) を算出した。基質濃度 [S] に 5 μM、ミカエリス定数 K_m に 6.12 μM を代入した。

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad \text{式 4}$$

2. 臨床上の影響の推定

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たときの JEx が引き起こす阻害による CYP2C9 の残存活性 (ε) を式 (5) より求めた。また、ジャバラ果汁 10 mL 摂取時の JEx による CYP2C9 阻害に占める HpMF および HxMF 両成分の寄与率を、JEx 中の HpMF および HxMF による CYP2C9 代謝に対する阻害率 (100 – 残存活性 (ε) [%]) 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。JEx 中の HpMF および HxMF 濃度は、HPLC-UV 法で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】

JEx は CYP2C9 に対する preincubation 時間依存的な阻害を示さなかった一方で時間非依存的な阻害作用を示した (IC₅₀ = 2.65% 等量、K_i = 1.62% 等量)。また、HpMF および HxMF はいずれも CYP2C9 を阻害し、その阻害強度は HxMF よりも HpMF で高かった (HpMF: IC₅₀ = 16.2 μM、K_i = 8.92 μM、HxMF: IC₅₀ = 56.2 μM、K_i = 31.8 μM)。

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 および 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。

第三章：CYP2C19 に対するジャバラ果汁の阻害特性解析

【背景・目的】

CYP2C19 は、プロトンポンプ阻害薬 omeprazole などの临床上重要な薬物の代謝を担う。一方、これまでに *in vitro* において CYP2C19 代謝活性は grapefruit juice 中成分 BG および DHB により阻害されることが示されている。さらに、臨床においても CYP2C19 基質薬 clopidogrel の活性代謝物の AUC は、grapefruit juice との同時摂取により水で摂取した場合の 14% まで低下したことが報告されている。一方で、grapefruit 以外の柑橘による CYP2C19 阻害を介した FDI についてはほとんど明らかになっておらず、ジャバラ果汁が CYP2C19 活性に与える影響も不明である。本章は、CYP2C19 に対するジャバラ果汁の阻害特性評価を目的とした。

【方法】

Recombinant CYP2C19 を用いて clopidogrel の 2 位カルボニル化活性を指標に、濃度 0, 30% 等量の JEx による CYP2C19 に対する時間依存的阻害作用を、阻害剤の事前曝露時間 (preincubation 時間; 0, 30 分) を変えて評価した。阻害剤の positive control として DHB を用いた。Clopidogrel の代謝物 2-Oxo-clopidogrel は LC-MS/MS 法により定量した。

【結果・考察】

JEx 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。一方で、preincubation を行わない条件 (preincubation 時間: 0 min) においては、30% 等量 (incubation 中は 3% 等量) の JEx 存在下における CYP2C19 の代謝速度は JEx 非存在下における CYP2C19 の代謝速度と比較して約 20% 低かった。臨床において 10 mL のジャバラ果汁を摂取したとき、消化管内溶液 210 mL により 4.5% に希釈されると仮定すると、CYP2C19 の残存活性は 80% 前後と推算できる。よって、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 および DHB を含まないジャバラ果汁に着目し、その CYPs 阻害活性評価およびその阻害活性の要因となる成分の探索を行った。

第一章では、CYP3A4 に対する JEx の阻害特性を検討するとともに、ジャバラ果汁

中の CYP3A4 阻害成分の単離を試みた。その結果、JEx は CYP3A4 を濃度および時間依存的に阻害したことから、ジャバラ果汁が CYP3A4 に対し MBI 作用を有することが示唆された。さらに、ジャバラ果汁から単離した HpMF および HxMF は、CYP3A4 に対する濃度および時間依存的阻害作用を示し、これらは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された。また、ジャバラ果汁を 10 mL 摂取したときの小腸における CYP3A4 活性は 7.22% まで低下すると算出され、臨床においてジャバラ果汁および HpMF や HxMF を含有する飲食物の摂取により CYP3A4 の阻害を介した FDI が惹起される可能性が示唆された。

第二章では、CYP2C9 に対する JEx、HpMF および HxMF の阻害活性を評価した。その結果、CYP3A4 に対する阻害特性とは異なり、JEx は CYP2C9 に対する時間依存的な阻害作用を示さなかった。一方で、JEx は 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 および 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。ジャバラ果汁 10 mL 摂取時の CYP2C9 の残存活性は 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。

第三章では、CYP2C19 に対する JEx の阻害特性を検討した。その結果、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、臨床上的の影響はほとんどないと推定された。

本研究により、CYP3A4 および 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 および HxMF が CYP3A4 および 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 および HxMF の阻害キネティクスパラメータは、これらの成分を含む天然物と CYP3A4 および 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。

【研究倫理委員会等の許可番号】

遺伝子組み換え実験安全委員会

承認番号：遺伝子組み換え型 CYP 膜発現と膜調整 15-01 (薬学部), D2022-010 (医学部).

論文目録

【主論文に関する原著論文】

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*. 2024 in press.