

一般用医薬品の新規薬物代謝酵素CYP2J2を介した
薬物間相互作用の可能性の評価

昭和大学薬学部

たじま まさたか
田島 正教

一般用医薬品の新規薬物代謝酵素 CYP2J2 を介した 薬物間相互作用の可能性の評価

昭和大学薬学部 田島 正教

(〒142-8555 東京都品川区旗の台1-5-8 電話番号：03-3784-8612)

分担研究者 昭和大学薬学部 佐藤 均
昭和大学薬学部 杉山 恵理花

要旨

本研究では一般用医薬品の中でも服用する機会の多い総合感冒薬に配合されている成分 (acetaminophen、aspirin、dextromethorphan、ethenzamide、ibuprofen、isopropylantipyrine、noscipine および tipegidine) を対象に、CYP2J2 に及ぼす影響を検討した。その結果、aspirin、ethenzamide、isopropylantipyrine、noscipine および tipegidine の5種にCYP2J2 活性阻害が認められ、ethenzamide および noscipine にCYP2J2 発現抑制がみられた。従って、これらの成分が配合された総合感冒薬を服用する際は、従来報告されているCYP3A4 などを中心とした相互作用に加え、CYP2J2 への影響も考慮した使用が必要であると考えられた。

1、調査研究目的

現在、本邦は世界でも類をみないほど急速に高齢化が進行し、総務省統計局のデータ (2018年9月現在)によると、65歳以上の高齢者は3557万人と総人口の28.1%を占めるに至っている。一般に高齢者は複数の疾病や合併症を持っていることが多く、服用する医薬品数が多くなる傾向にある。医薬品の服用数が多いほど薬物間相互作用がおこる可能性が高く、その併用には注意を要する。

薬物間相互作用は、発生機序により薬物動態学的相互作用と薬力学的相互作用に分類することができる。この中でも代謝過程による薬物動態学的相互作用の頻度が最も高いことが報告されている。相互作用により必要な血中濃度が得られず治療効果が得られないばかりでなく、必要以上に血中濃度が高くなり副作用が発現してしまう場合もある。相互作用による不利益を防ぐためには、それぞれの医薬品の代謝および相互作用に関わる代謝酵素に関する情報が必

須である。医薬品の代謝の中心を担うのがチトクロム P450 (CYP) であり、様々な CYP 分子種が存在している。臨床に用いられている医薬品の多くが CYP3A4/5、CYP2D6、CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19 を介して代謝されるため、これら主要な CYP を中心とした研究が行われてきた。しかし近年、CYP2J2 が肝臓や小腸に発現し、様々な薬物の代謝に関与することが分かり、2012 年の米国食品医薬品局 (FDA) ガイダンスで新薬候補の代謝過程において考慮すべき CYP 分子種として記載されるなど注目されてきている。特に小腸では CYP2J2 の発現割合が比較的高いこと、さらに影響を及ぼす物質の濃度が高くなることから、CYP2J2 を介した相互作用の影響は初回通過効果において大きい可能性が考えられる。

近年発売された医薬品では、その代謝や相互作用に CYP2J2 が関与しているか否かについて検討されている。しかし、すでに市販されている一般用医薬品に含まれる成分のほとんどは CYP2J2 に及ぼす影響について調査されていないため、CYP2J2 を介した薬物間相互作用が考慮されず見逃されている可能性がある。一般用医薬品の対象者は幅広く、様々な薬物との併用が想定されるため、これは早急に解決されなければならない課題である。

そこで本研究では、一般用医薬品の CYP2J2 を介した新たな薬物間相互作用の可能性を評価することを目的に基礎研究を行った。CYP2J2 で代謝される astemizole (基質薬物) を使用した代謝実験、培養肝細胞を使用した CYP2J2 の発現実験により、一般用医薬品成分 (aspirin、dextromethorphan、ethenzamide、ibuprofen、isopropylantipyrine、noscipine および tipepidine) の CYP2J2 に及ぼす影響を調べた。本研究により、医薬品の適正使用およびセルフメディケーションに貢献することが期待される。

2、調査研究方法

2-1 Astemizole を使用した代謝実験

0.1 M のリン酸バッファーに 5 pmol/mL recombinant CYP2J2、1.3 mM NADP⁺、3.3 mM G6P、0.4U/mL G6PDH および 12.5 - 1000 nM astemizole を添加し 37°C で 5 - 60 分間インキュベーションを行った。その後、mebendazole (内部標準) を含む氷冷したアセトニトリルを加えることにより反応を止めた。16,900 × g、4°C で 15 分間遠心し、上清の O-desmethyl astemizole (O-DA: 代謝物) 濃度を測定した。

2-1-1 インキュベーション時間の検討

500 nM astemizole にて、本反応を 5、10、20、30、60 分間行った。

2-1-2 基質濃度の検討

12.5、25、50、100、200、500、1000 nM astemizole にて本反応を 7 分間行った。

2-1-3 一般用医薬品成分による astemizole 代謝阻害実験

一般用医薬品成分の最終濃度が 50 μM になるように添加し、50 nM astemizole にて本反応を 7 分間行った。また、ポジティブコントロールとして CYP2J2 の阻害が報告されている plumbagin (50 μM) 1) と terfenadine (5 μM) 2) を使用した。

2-2 LC-MS/MS 条件

O-DA の濃度測定は、Lee et al. の報告 3) を参考に LC-MS/MS を用いて行った。高速液体クロマトグラフは、Pump Shimadzu LC20AD、AutoSampler Shimadzu SIL20AC (島津製作所製) を用いた。C18 カラムを使用し、カラムオーブンは 40 $^{\circ}\text{C}$ に設定した。移動相は 0.1% formic acid を含んだ acetonitrile : water = 30 : 70、流速は 0.2 mL/min で実施した。マススペクトロメーターには、Massspectrometer QTRAP 5500 (Absciex 社) を用いた。MS/MS システムのパラメータは、表 1 のように設定した。なお、サンプルの注入量は 10 μL とした。

2-3 細胞培養

実験にはヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞を用いた。10% ウシ胎児血清、100 IU/mL penicillin、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin を含む DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) で培養し、2 回 /week で継代を行った。

HepG2 細胞を 24 well plate に 1.5×10^5 cells/well で播種し、24 時間後に無血清 DMEM に交換した。さらに 24 時間後、各一般用医薬品成分の最終濃度が 50 μM になるように添加し 48 時間培養した。また、CYP2J2 の発現を低下させることが報告されている sodium nitroprusside (SNP) 4) をポジティブコントロールとして使用した。

2-4 Total RNA の抽出と real time RT-PCR

細胞を PBS で洗浄し、RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した。抽出は、RNeasy[®] Mini Kit 付属のプロトコールに従って行った。得られた total RNA 溶液は、NanoDrop[™] (Thermo Scientific) を用いて 260 nm および 280 nm の吸光度を測定し、純度の確認および濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) の算出を行った。

Total RNA 500 ng から ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて cDNA を合成後、TE buffer にて 20 倍希釈し cDNA TE buffer 溶液とした。PCR 反応は PowerSYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied biosystems) 10 μL 、目的遺伝子の Forward primer (5 pmol/ μL) 1.5 μL 、Reverse primer (5 pmol/ μL) 1.5 μL 、cDNA TE buffer 溶液 2 μL 、RNase free water 5 μL で実施した。温度条件は denaturation temperature として 95 $^{\circ}\text{C}$ で 15 秒、annealing temperature として 56 $^{\circ}\text{C}$ で 15 秒、elongation temperature として 72 $^{\circ}\text{C}$ で 45 秒とした。増幅過程の蛍光強度を Step One Real-Time PCR System (Applied biosystems) によりモニタリングした。mRNA 発

現量は β -actinを用いてノーマライズした。

3、調査研究成果

3-1 代謝実験

3-1-1 インキュベーション時間の検討

CYP2J2の代謝阻害を定量的に行うために、インキュベーション時間の検討を行った。インキュベーション時間10分までは、代謝物であるO-DAの濃度が時間に比例して増加したが、30分以降はO-DAの濃度が一定となり代謝に飽和がみられた(図1)。

3-1-2 基質濃度の検討

CYP2J2の代謝阻害を定量的に行うために、基質濃度の検討を行った。図2に、得られたastemizole濃度と代謝速度の関係およびLineweaver-Burk plotを示す。astemizole濃度の増加とともに代謝速度も増加したが、200 nM以降は飽和がみられた。Lineweaver-Burk plotから、本実験における最大代謝速度(V_{max})は2.36 pmol/min/pmol protein、Michaelis定数(K_m)は134 nMと算出した。

3-1-3 一般用医薬品成分によるastemizole代謝阻害実験

CYP2J2の活性を阻害することが報告されているplumbagin (50 μ M)とterfenadine (5 μ M)は、CYP2J2活性をコントロールの10%未満に抑えた(図3)。検討した一般用医薬品8成分の中でaspirin、ethenzamide、isopropylantipyrine、noscaphineおよびtipepidineの5種にCYP2J2の有意な阻害が認められた。特にnoscaphineは、ポジティブコントロールと同程度の強い阻害がみられた。

3-2 一般用医薬品成分のCYP2J2発現量に及ぼす影響

SNPは、CYP2J2のmRNA発現量をコントロールの30%程度に抑制した(図4)。検討した一般用医薬品8成分の中でethenzamideおよびnoscaphineがCYP2J2の発現を有意に抑えた。

4、考察

CYP2J2は、基質として用いたastemizoleのほか、ebastine、albendazole、amiodaroneおよびrivaroxabanなど臨床で使用されている多くの薬物を代謝することが報告されてい

る。astemizole の代謝には肝臓と小腸の CYP2J2 が関与するが、その寄与は異なることが報告 5) されている。この理由として、肝臓と小腸で発現している CYP 分子種の種類の差がある。肝臓には様々な CYP 分子種が発現しているが、CYP3A4 の発現量が最も多く、それに CYP2C9/19、CYP1A2、CYP2E1、CYP2D6 が続く。CYP2J2 の発現量は少なく、日本人において総 CYP の 1.8% 程度という報告 6) がある。一方、小腸においても CYP3A4 の発現量が最も多く、それに CYP2C9/19 が続くのは同様であるが、その次に CYP2J2 の発現量が多い (0.2-4% 程度) 7)。小腸では、これら 3 種類以外の CYP 分子種はほとんど発現していないと考えられている。肝臓では CYP2D6 や CYP4F12 も astemizole の代謝に関与するため、CYP2J2 が阻害されたとしても他の分子種によって代謝が補われるため影響は少ない。従って、CYP2J2 の代謝活性・発現量の変化は、特に経口投与時の小腸における初回通過効果に大きく影響するものと考えられる。

本研究では、広く使用されている一般用医薬品である総合感冒薬に配合されている成分に着目し、CYP2J2 に及ぼす影響を検討した。初めに、CYP2J2 の代謝活性に影響を及ぼすか否かを調べた。まず代謝活性に及ぼす影響を定量的に解析するための実験条件の検討を行った。CYP2J2 による astemizole の代謝反応開始後、10 分までは代謝物である O-DA の濃度が反応時間とともに増加した (図 1)。そこで、これ以降の実験ではインキュベーション時間を 10 分以内の 7 分と定めた。さらに、酵素反応は K_m 値より低い基質濃度で実施する必要があるため、種々の astemizole 濃度で実験を行い、Lineweaver-Burk plot を描くことにより K_m 値を算出した (図 2)。 K_m 値が 134 nM と算出されたため、本実験では基質である astemizole の濃度を K_m 値の半分以下である 50 nM で行うこととした。インキュベーション時間および基質濃度が決まったので、各一般用医薬品成分の CYP2J2 の活性に及ぼす影響を測定した。検討した成分 8 種の中で aspirin、ethenzamide、isopropylantipyrene、noscipine および tipepidine に CYP2J2 阻害が認められ、特に noscipine はコントロールの 7% にまで活性を抑え、強い CYP2J2 阻害作用を持つことが明らかとなった (図 3)。

次に、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞を用いて一般用医薬品成分が CYP2J2 の発現に影響を及ぼすか検討した。本来は CYP2J2 の代謝の寄与が大きいと考えられる腸管細胞での検討が適切であると考えられるが、腸管細胞を使用しての CYP2J2 発現変化を測定している報告がなかったため HepG2 細胞を用いた。一般用医薬品成分を 48 時間 HepG2 細胞に処置したところ、ethenzamide および noscipine が CYP2J2 mRNA 発現量を有意に抑えた (図 4)。従って、ethenzamide および noscipine は、CYP2J2 の活性を抑えるだけでなくその発現自体も抑制することが明らかとなった。

本研究の結果より、CYP2J2 で代謝される医薬品と aspirin、ethenzamide、isopropylantipyrene、noscipine および tipepidine の併用は、基質薬物の代謝が阻害されるため注意を要することが考えられた。また、同時併用のみならず ethenzamide および noscipine は CYP2J2 の発現量を減少させる可能性があるため、基質薬物の減量や CYP2J2 の回復を待ってから服用など、何らかの対策が必要であると考えられる。本研究の結果は *in vitro* における実験結果であり、生

体内でも同様の反応が起きるのか、基質薬物の濃度変化が生じるのかなど更なる検討が必要であるものの、一般用医薬品において CYP2J2 を介した相互作用の可能性を示した初めての報告である。一般用医薬品を服用する際にも、現在まで考えられていた相互作用のほかに、CYP2J2 への影響も考慮した使用が必要であることが示唆された。

5、まとめ

本研究により、aspirin、ethenzamide、isopropylantipyrine、noscipine および tipepidine の5種に CYP2J2 活性阻害が認められ、ethenzamide および noscapine に CYP2J2 発現抑制がみられた(表 2)。これらの医薬品は、CYP2J2 を介した相互作用が生じる可能性がある。

6、調査研究発表(口頭又は誌上発表)

関連学会(日本薬学会または日本医療薬学会)にて発表を予定している。

7、引用文献

1. Lu J, Liu D, Zhou X, Chen A, Jiang Z, Ye X, Liu M, Wang X. Plant natural product plumbagin presents potent inhibitory effect on human cytochrome P450 2J2 enzyme. *Phytomedicine*. 2018. 39:137-145.
2. Lee E, Kim JH, Shon JC, Wu Z, Kim HJ, Gim M, Lee T, Liu KH. Terfenadone is a strong inhibitor of CYP2J2 present in the human liver and intestinal microsomes. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2018. 33:159-163.
3. Lee B, Wu Z, Sung SH, Lee T, Song KS, Lee MY, Liu KH. Potential of decursin to inhibit the human cytochrome P450 2J2 isoform. *Food Chem Toxicol*. 2014. 70:94-9.
4. Cui PH, Lee AC, Zhou F, Murray M. Impaired transactivation of the human CYP2J2 arachidonic acid epoxygenase gene in HepG2 cells subjected to nitrate stress. *Br J Pharmacol*. 2010. 159:1440-9.
5. Matsumoto S, Hiramata T, Kim HJ, Nagata K, Yamazoe Y. In vitro inhibition of

human small intestinal and liver microsomal astemizole O-demethylation: different contribution of CYP2J2 in the small intestine and liver. *Xenobiotica*. 2003, 33:615-23.

6. Yamazaki H, Okayama A, Imai N, Guengerich FP, Shimizu M. Inter-individual variation of cytochrome P4502J2 expression and catalytic activities in liver microsomes from Japanese and Caucasian populations. *Xenobiotica*. 2006, 36:1201-9.

7. Peters SA, Jones CR, Ungell AL, Hatley OJ. Predicting Drug Extraction in the Human Gut Wall: Assessing Contributions from Drug Metabolizing Enzymes and Transporter Proteins using Preclinical Models. *Clin Pharmacokinet*. 2016, 55:673-96.

図、表及び写真

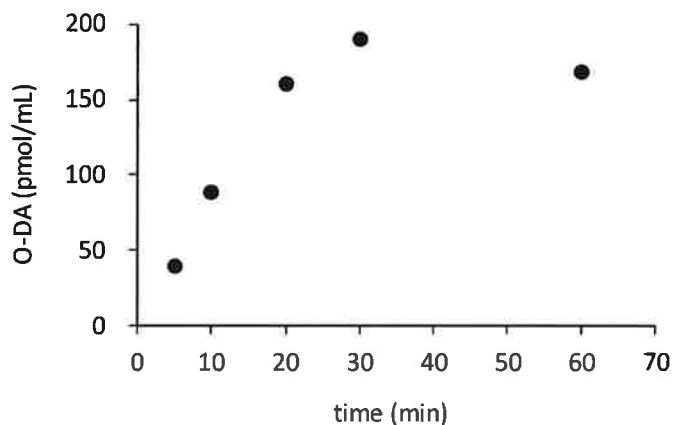


図1 インキュベーション時間と O-DA 濃度の関係

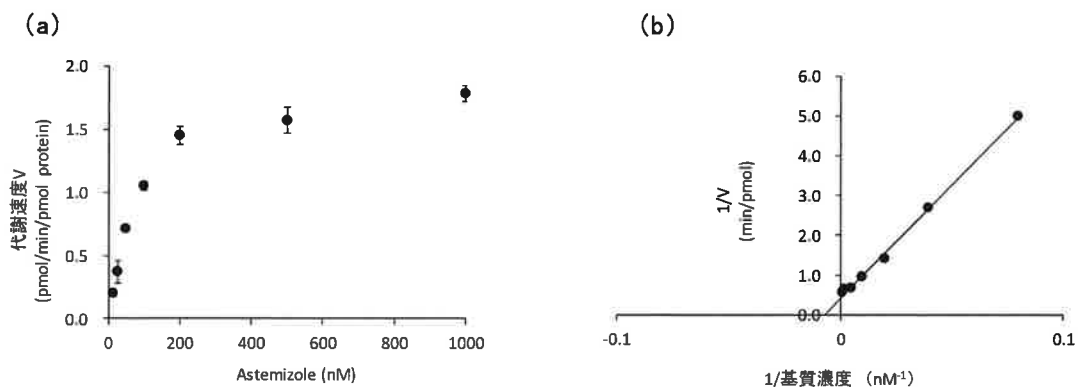


図2 (a) astemizole 濃度と代謝速度の関係、(b) Lineweaver-Burk plot

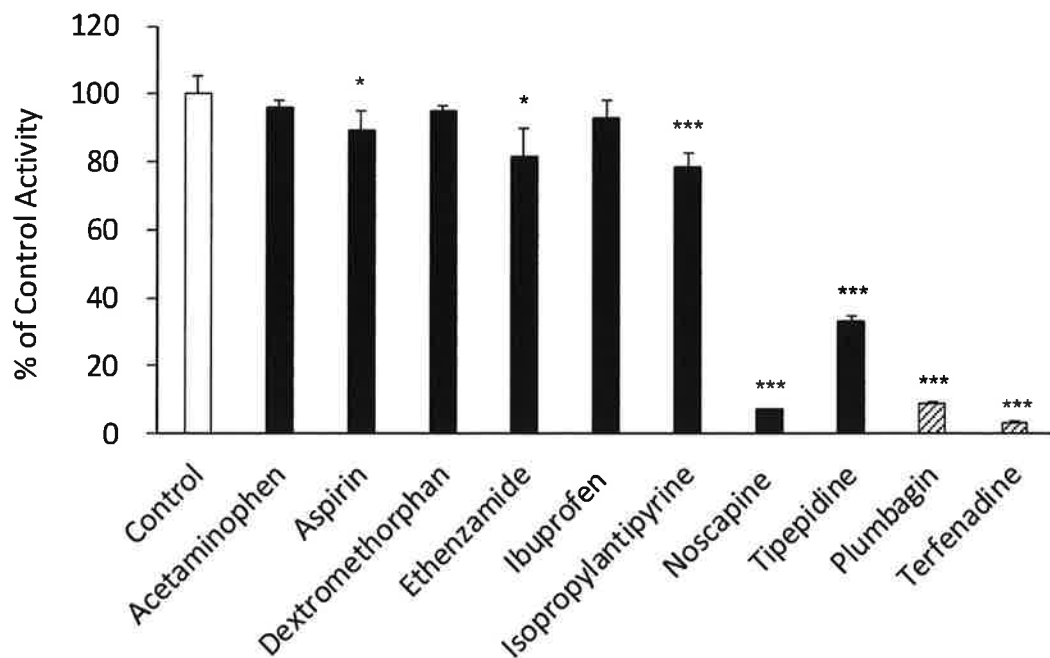


図3 一般用医薬品成分による CYP2J2 活性変化 (平均値±標準偏差、n=4)

*:P < 0.05, ***:P < 0.001 vs Control

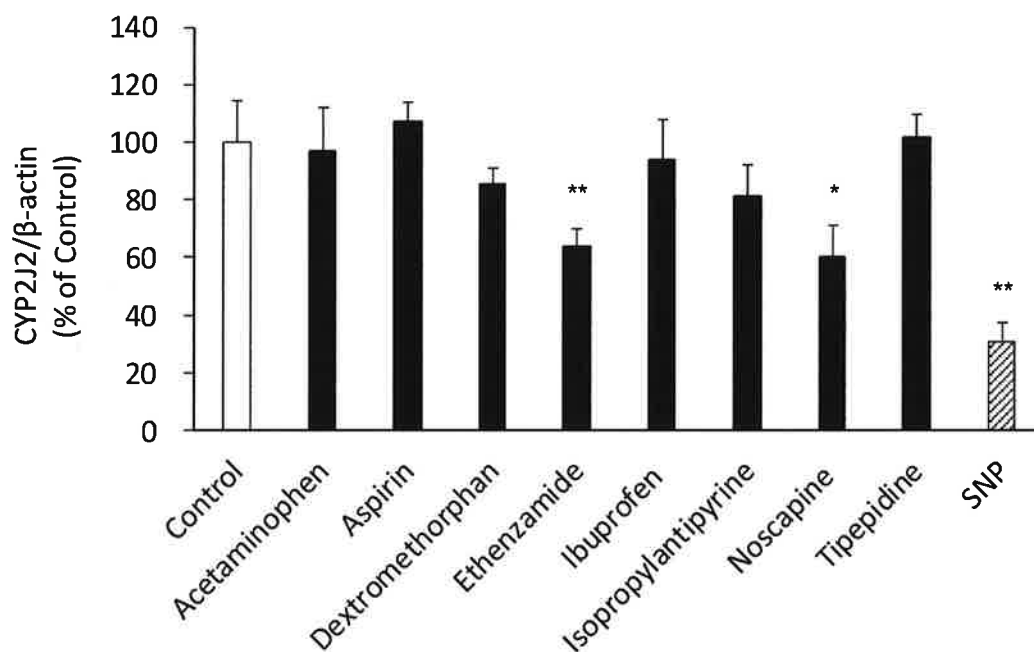


図4 一般用医薬品成分による CYP2J2 mRNA 発現量変化 (平均値±標準偏差、n=4)

*:P < 0.05, **:P < 0.01 vs Control

表1 MS/MS システムの設定

	O-DA	mebendazole
Polarity	Positive	Positive
Q1 mass (Da)	445.270	296.233
Q3 mass (Da)	204.100	264.000
Declustering potential (V)	96	96
Entrance potential (V)	10	10
Collision energy (V)	35	29
Collision cell exit potential (V)	12	18
Curtain gas (psi)	10	10
Collision gas (psi)	8	8
Ion spray voltage (V)	4500	4500
Source temperature (°C)	700	700
Ion source gas 1 (psi)	50	50
Ion source gas 2 (psi)	50	50

表2 一般用医薬品成分による CYP2J2 への影響のまとめ

	Acetaminophen	Aspirin	Dextromethorphan	Ethenzamide
activity	↓	—	—	↓
mRNA	—	—	—	↓
	Ibuprofen	Isopropylantipyrene	Noscapine	Tipepidine
activity	—	↓	↓↓	↓↓
mRNA	—	—	↓	—