

# カニクイザル シトクロム P450 2C 分子種の 基質認識性に関する網羅的解析研究

保坂 信哉

## 緒言

医薬品開発における非臨床試験の主な目的は、ヒトでの毒性および薬効を予測することにある。非臨床試験において、進化的にヒトに近いという理由でカニクイザル（サル）が広く使用されているが、近年、薬物代謝において稀にヒトとサルの間で種差が認められることが明らかとなってきた。このような種差は、ヒトでの毒性および薬効の予測を困難にするため、医薬品開発において重要な問題である。シトクロム P450 (P450 または CYP) はヒトにおける主要な薬物代謝酵素であり、中でも CYP3A4 および CYP2C 分子種 (CYP2C9 および CYP2C19) の薬物代謝への関与が大きいことが報告されている。したがって、非臨床試験時のサルでの薬物代謝においても、これらの P450 分子種の関与が大きいと推察される。サルの肝臓における P450 分子種の発現は基本的にはヒトに類似しているが、サルにはいずれのヒト P450 とも対応関係の取れない分子種である CYP2C76 が発現している。また、CYP2C76 はピタバスタチンにおけるヒトとサルの薬物動態の種差の主要因であることが報告されている。加えて、サル CYP2C 分子種による薬物代謝は、ヒトと同様に複数の分子種が関与しており複雑であることが予想されるが、その基質認識性に関する検討は未だ十分には行われていない。そこで本研究では、サル CYP2C 分子種のうち主要なものと考えられる CYP2C9、CYP2C19 および CYP2C76 の基質認識性を網羅的に解析した。

## 1. サル CYP2C 分子種の基質認識性の全体像

市販の 89 化合物を用い、サル CYP2C 分子種の基質認識性を網羅的に評価した。選択基準は、アメリカ食品医薬品局 (FDA) あるいは欧州医薬品庁 (EMA) の薬物相互作用ガイドランスあるいはガイドラインに記載のある化合物およびヒト CYP2C 分子種の基質または阻害剤として文献報告のある化合物とした。各サル CYP2C 分子種を発現した大腸菌の膜画分を用いて代謝試験を実施し、30 分間反応後の化合物の消失が 20% を超えたものを基質と判断した。その結果、CYP2C19、CYP2C9 および CYP2C76 において、それぞれ 89 化合物中 34、20 および 19 化合物が基質であることが明らかとなった。

## 2. サル CYP2C19 の基質認識性

サル CYP2C19 のアミノ酸配列はヒト CYP2C9 およびヒト CYP2C19 と、それぞれ 93% および 92% の相同性を示すことが報告されている。サル CYP2C19 の基質であった 34 化合物中 30 化合物はヒト CYP2C9 またはヒト CYP2C19 の基質あるいは阻害剤として報告のある化合物であった (Fig. 1)。

サル CYP2C19 基質のうち、以下の 9 化合物の代謝はサル CYP2C19 に高い選択性を示した (Fig. 1)。そのうち Diazepam、Omeprazole、Bufuralol、Midazolam、Propranolol および Loratadine はヒト CYP2C19 の基質として報告のある化合物であった。一方、Diclofenac、Flurbiprofen および Warfarin はヒトでは CYP2C9 の基質として報告のある化合物であった。

サルで情報のなかった Loratadine 代謝についてより詳細に検討した結果、Loratadine の代謝はサル CYP2C19 とヒト CYP2C19 で同等の固有クリアランスを示し、また、主代謝物は両者ともに Desloratadine であった。したがって、CYP2C19 による Loratadine 代謝はヒトとサルでよく類似していることが示された。

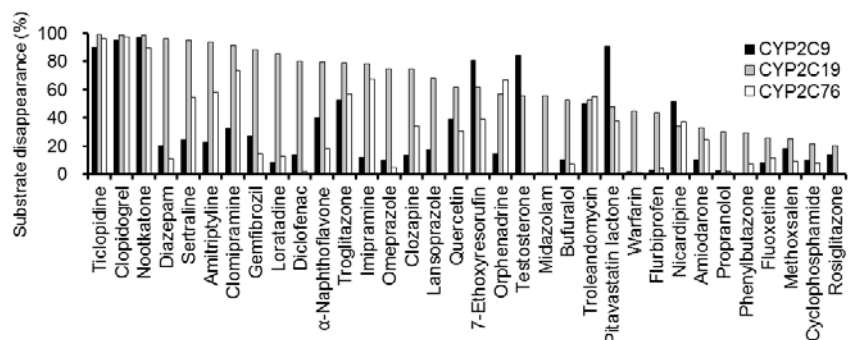


Fig. 1 Substrate disappearance of 34 compounds metabolized by monkey CYP2C19.

## 3. サル CYP2C9 の基質認識性

サル CYP2C9 のアミノ酸配列はヒト CYP2C9 およびヒト CYP2C19 と、それぞれ 93% および 91% の相同性を示すことが報告されている。サル CYP2C9 の基質であった 20 化合物中 17 化合物はヒト CYP2C9 またはヒト CYP2C19 の基質あるいは阻害剤として報告のある化合物であった。

サル CYP2C9 基質のうち、Efavirenz の代謝はサル CYP2C9 に高い選択性を示した。ヒトにおいて

Table 1 Intrinsic clearance ( $CL_{int}$ ) values for efavirenz.

P450	$CL_{int}$ (mL/min per nmol P450)
サル CYP2C9	1.54
サル CYP2C19	<0.10
サル CYP2C76	0.14
サル CYP2B6	0.15
ヒト CYP2B6	1.86

Efavirenz の主代謝酵素は CYP2B6 であるが、サル CYP2B6 では代謝反応はほとんど進行しなかった (Table 1)。これより、Efavirenz の代謝には種差があることが示された。なお、Efavirenz のサル CYP2C9 およびヒト CYP2B6 による主代謝物は、8-hydroxyefavirenz および 8,14-dihydroxyefavirenz であり、両者は一致した。

#### 4. サル CYP2C76 の基質認識性

サル CYP2C76 はいずれのヒト P450 とも対応関係の取れない分子種であり、ヒト CYP2C 分子種とのアミノ酸配列相同性は 70% 程度と低いことが報告されている。サル CYP2C76 は Nootkatone のような小さい分子から Troleandomycin のような大きい分子まで、様々な構造の化合物を代謝することが明らかとなった。

サル CYP2C76 基質のうち、Nifedipine の代謝はサル CYP2C76 に高い選択性を示した。また、サル CYP2C76 はヒトでは報告のないユニークな Nifedipine 代謝物を生成した (Fig. 2A)。LC-MS/MS 分析およびドッキングシミュレーションの結果、その代謝物は Nifedipine のジヒドロピリジン環のメチル基が酸化された代謝物であると推定された (Fig. 2B)。

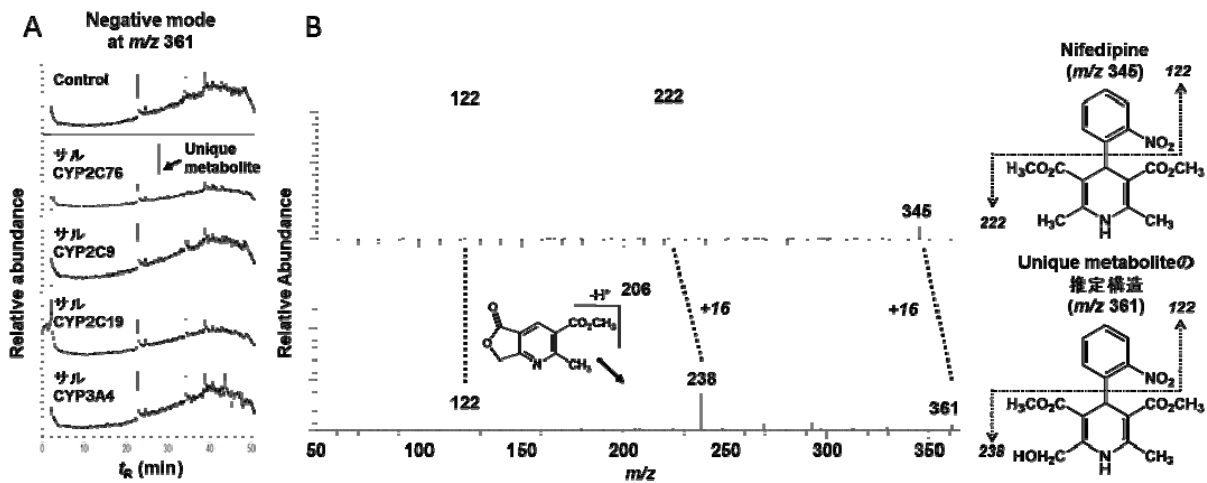


Fig. 2 Unique metabolite of nifedipine formed by monkey CYP2C76.

#### 結論

サル CYP2C19 の基質認識性は、ヒト CYP2C9 またはヒト CYP2C19 に類似していた。サル CYP2C9 の基質認識性は、Efavirenz のような一部の例外はあるものの、ヒト CYP2C9 またはヒト CYP2C19 に概ね類似していた。一方、ヒトには対応する P450 が存在しないサル CYP2C76 は、様々な構造の化合物を代謝し、かつヒトでは報告のない代謝物を生成したことから、薬物代謝におけるヒトとサルの種差の一因となる可能性が示唆された。なお、サル CYP2C8 の基質認識性についても部分的に解析し、ヒト CYP2C8 に類似していることおよび上記の他のサル CYP2C 分子種での結論に影響しないことを確認した。

以上より、サル CYP2C 分子種の基質認識性を網羅的に明らかにした。本研究で得られた知見は、サル P450 の肝臓における発現量および代謝速度等の定量的な情報と組み合わせることにより、サルを用いた非臨床試験データを精度良くヒトへ外挿するために極めて有用であると考えられた。

#### 本研究の誌上発表

- Hosaka S, Murayama N, Satsukawa M, Shimizu M, Uehara S, Fujino H, Iwasaki K, Iwano S, Uno Y, and Yamazaki H. (2015) Evaluation of 89 compounds for identification of substrates for cynomolgus monkey CYP2C76, a new bupropion/nifedipine oxidase. *Drug Metabolism and Disposition* 43(1):27-33.
- Hosaka S, Murayama N, Satsukawa M, Uehara S, Shimizu M, Iwasaki K, Iwano S, Uno Y, and Yamazaki H. (2015) Comprehensive evaluation for substrate selectivity of cynomolgus monkey cytochrome P450 2C9, a new efavirenz oxidase. *Drug Metabolism and Disposition* 43(7):1119-1122.
- Hosaka S, Murayama N, Satsukawa M, Uehara S, Shimizu M, Iwasaki K, Iwano S, Uno Y, and Yamazaki H. Similar substrate specificity of cynomolgus monkey cytochrome P450 2C19 to reported human P450 2C counterpart enzymes by evaluation of 89 drug clearances. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, in press.