

MKC-963 による CYP3A 酵素誘導の種差に関する研究  
- ヒトおよびラット PXR 活性化と相互作用する  
アミノ酸残基の種差 -

2006 年

清水 俊之

## 目次

略号一覧	4
緒言	5
第一章 MKC-963 によるラット CYP3A 誘導試験、および健常人を対象とした MKC-963 の臨床試験	8
第一節 序文	8
第二節 方法	8
第一項 MKC-963 によるラット CYP3A 誘導試験	8
1. 試薬	8
2. ラットへの MKC-963 および PCN の投与	9
3. 肝ミクロゾーム中のテストステロン 6 水酸化活性の測定	9
4. 分析方法	9
5. 統計解析	9
第二項 健常人を対象とした MKC-963 の臨床試験	10
1. 試薬	10
2. 被験者	10
3. 試験プロトコール	10
4. 血漿の前処理方法	10
5. MKC-963 の分析方法	11
6. 薬物動態パラメーターの算出	11
7. 尿中 6-OHF および F の定量	11
8. 統計解析	11
第三節 結果	13
第一項 MKC-963 によるラット CYP3A 誘導試験	13
第二項 健常人を対象とした MKC-963 の臨床試験	14
第四節 考察	16
第五節 小活	17
第二章 ヒト肝初代培養系およびヒト CYP 分子種発現系を用いた MKC-963 による 自己誘導に関する検討	18
第一節 序文	18

第二節	方法	18
1.	試薬	18
2.	初代ヒト肝細胞の培養	19
3.	化合物の暴露	19
4.	RNA 抽出およびリアルタイム PCR による CYP3A4 の mRNA 発現量の測定	19
5.	CYP3A4 の活性測定	19
6.	ヒト CYP 分子種発現系を用いた MKC-963 の代謝	20
7.	分析条件	20
8.	ヒト CYP 分子種による MKC-963 代謝への寄与率の推定	20
9.	統計解析	21
第三節	結果	22
第四節	考察	24
第五節	小活	25
第三章 MKC-963 によるヒトおよびラット PXR 活性化の種差に関する検討		26
第一節	序文	26
第二節	方法	26
1.	試薬	26
2.	プラスミド	26
3.	細胞培養およびレポーター遺伝子アッセイ	27
第三節	結果及び考察	28
第四節	小活	30
第四章 MKC-963 によるヒトおよびラット PXR 活性化の種差に関するアミノ酸 残基の推定		31
第一節	序文	31
第二節	方法	31
1.	試薬	31
2.	プラスミド	32
3.	細胞培養およびレポーター遺伝子アッセイ	32
4.	ヒト PXR-LBD の X 線結晶構造を用いた分子力場計算	32
5.	使用ソフトウェア	33
6.	統計解析	33

第三節	結果	34
第四節	考察	36
第五節	小活	38
第五章 QCM 法を利用したヒト PXR-LBD タンパクとリガンドとの結合に関する検討		
	する検討	39
第一節	序文	39
第二節	方法	39
1.	試薬	39
2.	ヒト PXR-LBD タンパクの発現および精製	39
3.	QCM 法を用いたヒト PXR-LBD タンパクと化合物との結合実験	41
4.	統計解析	41
第三節	結果	42
第四節	考察	44
第五節	小活	46
	総括	47
	参考文献	49
	<i>Appendix</i>	56
	主論文目録	59
	謝辞	60
	主査、副査名	61

## 略号一覧

AUC	area under the plasma concentration-time curve
6 -OHF	6 -hydroxycortisol
F	cortisol
CYP	cytochrome P450
DBD	DNA binding domain
DMSO	dimethyl sulfoxide
Q (Gln)	glutamine
H (His)	histidine
I (Ile)	isoleucine
LBD	ligand binding domain
$C_{max}$	maximum plasma concentration
PCR	polymerase chain reaction
F (Phe)	phenylalanine
PXR	pregnane X receptor
prPXRE	proximal pregnane X receptor response element
S (Ser)	serine
SRC-1	steroid receptor coactivator-1
W (Trp)	tryptophan
$t_{1/2}$	terminal half-life
$t_{max}$	time to reach $C_{max}$
XREM	xenobiotic-responsive enhancer module

## 緒言

MKC-963 { (R)-1-(1-cyclohexylethylamino)-4-phenylphthalazine、Fig.1 } は血小板凝集抑制作用を持つ循環障害治療薬として、三菱化学株式会社において合成された新規化合物である。ラットを用いた誘導試験では、MKC-963 による Cytochrome P450 3A (CYP3A) の誘導は認められなかったが、1990 年代に実施した健常人を対象とした臨床試験において、MKC-963 による CYP3A 誘導が示唆された。さらに MKC-963 自身の血漿中濃度も低下したことから、自己誘導であった可能性も示唆された。CYP3A は 6 割以上の上市医薬品の代謝に関与する酵素であり[ 1 ]、MKC-963 が適用される予定であった循環障害治療の分野においては、抗高血圧薬や抗高脂血症薬を含む多くの医薬品が併用されている [ 2, 3, 4, 5, 6 ]。したがって、MKC-963 による CYP3A の誘導は薬物代謝相互作用を引き起こす可能性が高く、さらに自己誘導は自身の代謝を誘導することにより薬効の減弱につながる深刻な問題であったことから、MKC-963 の開発は中断された。臨床試験開始後に開発を中断することは、臨床試験に至るまでに要した膨大な成果が無駄になり、医薬品開発上の大きな損失である。そこで、MKC-963 による CYP3A 誘導のヒトおよびラット間での種差の原因を解明し、その成果を今後の医薬品開発に利用することは非常に重要であると考え、本研究を行った。本論文の第一章では、本研究の発端であるラットを用いた MKC-963 による CYP3A 誘導試験、および健常人を対象とした MKC-963 の臨床試験の結果を記した。

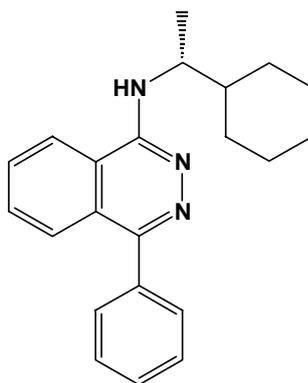


Fig. 1. Chemical structure of MKC-963

臨床試験の結果から MKC-963 の自己誘導が示唆されたが、臨床試験を実施していた当時はヒトにおける自己誘導の *in vitro* 系による事前の推定は困難であった。しかし、現在ではヒト肝初代培養系を用いた CYP3A 誘導試験や化合物の代謝に関与する CYP 分子種の推定は比較的容易に実施することができる *in vitro* 実験である。実際、ヒト肝初代培養系を用いることにより、臨床的に CYP3A 誘導を起こすことが知られているリファンピシン、フェノバルビタール、フェニトイン、トログリタゾンなどを *in vitro* で評価することができる [7, 8, 9, 10]。さらに、化合物の代謝に関与するヒト CYP 分子種を肝マイクロゾームやヒト CYP 発現系を用いることにより推定することが可能となっている [11, 12]。そこで第二章では、MKC-963 が CYP3A4 を誘導するか否かをヒト肝初代培養系を用いて検討し、さらに MKC-963 が CYP3A4 の基質となるか否かをヒト CYP 分子種発現系を用いて検討することにより、健常人を対象とした臨床試験で示唆された MKC-963 の自己誘導を *in vitro* で検証し、その結果を記した。

第一章の結果から MKC-963 による CYP3A の誘導に種差が存在する可能性が示唆された。CYP3A 誘導の種差は、調節因子である Pregnane X Receptor (PXR) の活性化の種差に起因することがいくつかの化合物について報告されている [13, 14, 15]。例えばリファンピシンは、ヒト PXR を活性化するがラット PXR を活性化しないため、ヒトでは CYP3A を誘導し、ラットでは CYP3A を誘導しないと報告されている [14, 15]。MKC-963 による CYP3A 誘導にも、リファンピシンと同様に、ヒトとラット間で種差が存在することから、この原因も MKC-963 による PXR 活性化にヒトとラット間で種差が存在するためである可能性が考えられる。そこで、第三章では、MKC-963 によるヒトおよびラット PXR の活性化をレポーター遺伝子アッセイを用いて測定することにより PXR 活性化の種差が CYP3A 誘導の種差の要因となるか否かについて検討し、その結果を記した。

PXR は N 末に DNA 結合領域 (DNA Binding Domain, DBD)、C 末にリガンド結合領域 (Ligand Binding Domain, LBD) を持つ核内受容体であり [13, 16, 17, 18]、ヒトとラット PXR の DBD は 96% の相同性があるのに対し、LBD の相同性は 76% と低いことが知られている [14, 19]。PXR 活性化の種差は、この LBD のアミノ酸配列の種差に起因することが、いくつかの化合物で報告されている [14, 19]。例えば、リファンピシンとヒト PXR-LBD との共結晶構造を X 線で解析することにより、リファンピシンがヒト PXR と相互作用するアミノ酸が推定されている [20]。さらにリファンピシンがヒト PXR と相互作用するアミノ酸をラット PXR のアミノ酸へ置換することにより、リファンピシンによる PXR の活性化が消失することから、リファンピシンによるヒトとラット PXR 活性化の種差は、相互作用するアミノ酸残基の種差によると推定されている [21, 22]。リファンピシンと同様に、MKC-963 による PXR 活性化の種差も MKC-963 がヒト PXR と相互作用するアミノ酸に、ラット PXR と相違があったために生じた可能性が考えられる。そこで第四章では、MKC-963 がヒト PXR と相互作用するアミノ酸を推定し、ラット PXR のアミノ酸配列と比較することにより、MKC-963 によるヒトおよびラット PXR 活性化の種差に重要なアミノ酸について検討し、その結果を記した。

創薬の初期段階において化合物によるヒト PXR の活性化をレポーター遺伝アッセイにて検討し、ヒト PXR を活性化するリガンドを除外しておくことが、ヒトで CYP3A を誘導しない医薬品の開発に重要であると考えられる[23, 24, 25, 26]。しかし、創薬の初期段階においては、多種多様な化合物が存在するため、細胞毒性などの理由でレポーター遺伝アッセイを実施できない場合も想定される。ヒト PXR はリガンドと結合することにより活性化されることから、ヒト PXR-LBD タンパクを用いてリガンドとの結合を測定することができれば、細胞毒性のある化合物や細胞へ取り込まれない化合物であっても誘導能を測定できる可能性がある。一方、生体分子間相互作用を測定する方法として、水晶発振子マイクロバランス法 (quartz-crystal microbalance、QCM 法) が開発されている[27, 28]。QCM 法は極微量の物質の結合を振動数変化として検出する測定法である。そこで第五章では、多種多様な化合物からヒト PXR のリガンドを除外するための新たな測定法として、QCM 法を用いたヒト PXR-LBD タンパクとリガンドとの結合について検討し、その結果を記した。

## 第一章 MKC-963 によるラット CYP3A 誘導試験、および健常人を対象とした MKC-963 の臨床試験

### 第一節 序文

PCN (プレグネノロン 16 カルボニトリル) はラット CYP3A の誘導剤であると報告されている [ 29, 30, 31 ]。Lake らは、PCN ( 100 mg/kg ) をラットに 4 日間経口投与することにより、肝ミクロゾーム中の CYP3A 活性のマーカであるテストステロン 6 水酸化活性が誘導されることを報告している [ 30 ]。そこで、PCN ( 100 mg/kg ) を陽性対照とし、30 mg/kg および 100 mg/kg の MKC-963 をラットに 4 日間経口投与し、肝ミクロゾーム中のテストステロン 6 水酸化活性を測定することにより、MKC-963 が CYP3A を誘導するか否かについて検討した。

一方、尿中 6 ヒドロキシコルチゾールとコルチゾールの比 ( 6 -OH/F 比 ) は、ヒトにおける CYP3A 誘導のマーカとして用いられている [ 32, 33, 34 ]。この方法は尿中に排泄された内因性の 6 ヒドロキシコルチゾールとコルチゾールを測定するため、非侵襲的であり、基質となる薬剤の追加投与も不要な安全で簡便な試験法である。尿中への 6 ヒドロキシコルチゾールやコルチゾールの排泄量には、日内変動があり個人差も大きい。24 時間蓄尿した尿の 6 ヒドロキシコルチゾールやコルチゾールを測定し、その比 ( 6 -OH/F 比 ) をとると、個体内の変動は比較的小さいと報告されている [ 34 ]。そこで、健常人を対象とした MKC-963 の臨床試験においては、MKC-963 の血漿中濃度を測定し MKC-963 の体内動態を明らかにすると共に、24 時間蓄尿した尿中の 6 ヒドロキシコルチゾールおよびコルチゾールを測定し、その比 ( 6 -OH/F 比 ) を各個人の投与前の値と比較することにより、MKC-963 が CYP3A を誘導するか否かについても検討した。

### 第二節 方法

#### 第一項 MKC-963 によるラット CYP3A 誘導試験

##### 1. 試薬

MKC-963 は三菱化学株式会社 ( Tokyo, Japan ) で合成されたものを使用した。Pregnenolone 16 -carbonitrile ( PCN )、Testosterone、6 -Hydroxytestosterone および 17 -Methyltestosterone は、それぞれ Sigma-Aldrich ( St. Louis, MO, USA )、東京化成工業株式会社 ( Tokyo, Japan )、住化分析センター株式会社 ( Osaka, Japan ) および和光純薬工業株式会社 ( Osaka, Japan ) より購入した。NADP<sup>+</sup>、glucose-6-phosphate および

glucose-6-phosphate dehydrogenase はオリエンタル酵母株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。この他の試薬は特級を用いた。

## 2. ラットへの MKC-963 および PCN の投与

日本チャールスリバー株式会社 (Kanagawa, Japan) より購入した雄の Sprague-Dawley rat (160-180 g) に、MKC-963 (30、100 mg/kg) または PCN (100 mg/kg) を 4 日間、経口投与した。溶媒投与群には等量の (5 mL/kg) 0.5% (w/v) カルボキシメチルセルロースを投与した。最終投与の翌日にラットを犠殺し、定法により肝ミクロゾームを調製し、使用時まで -80 °C で保存した。タンパク定量は BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA) を用いて測定した。

## 3. 肝ミクロゾーム中のテストステロン 6-β-水酸化活性の測定

Testosterone (250 μM、基質)、1 mM NADP<sup>+</sup>、8 mM glucose-6-phosphate、1 IU/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase、6 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 mM EDTA および 0.05 mg 肝ミクロゾームを含む 0.5 mL の 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.4) を反応液とし、37 °C で 10 分間インキュベートした。2 mL のジクロロメタンを加え反応を停止し、内部標準物質として 50 μL の 17β-methyltestosterone (120 μM in methanol) を添加した。1,500 × g、4 °C、5 分の遠心分離の後、有機層を新しい試験管に移し、窒素乾固した。残渣を 250 μL のアセトニトリルに溶解し、一部 (50 μL) を HPLC にて分析した。

## 4. 分析方法

6-β-Hydroxytestosterone の測定は、以下の HPLC 条件で実施した。

分析機器：	Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan)	
分析カラム：	Inertsil ODS-3 (3 μm, 100 mm × 4.6 mm; GL science)	
カラム温度：	35	
移動相 A：	50% MeOH	
移動相 B：	60% MeOH	
グラジエント：	Time (min)	B (%)
	0	0
	15	67
	20	100
	30	100
流速：	0.5 mL/min	
検出：	UV 240 nm	

## 5. 統計解析

結果は means  $\pm$  S.D で記載した。Student's t-test は SAS software (version 8.2, SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。P 値が 0.05 以下を統計的に有意差ありと判断した。

## 第二項 健常人を対象とした MKC-963 の臨床試験

### 1. 試薬

MKC-963 および d5MKC-963 は三菱化学株式会社 (Tokyo, Japan) で合成されたものを使用した。

### 2. 被験者

20 から 35 歳の健常成人男子 6 名を被験者とした。被験者の体重(kg)は、「(身長(cm) 100  $\times$  0.9)」の 20%以内であり、事前に実施した健康診断、臨床検査に基づき本試験への参加が妥当と診断され、試験の 2 週間以内に併用薬を使用していない者を選択した。本試験実施中はアルコール、グレープフルーツやグレープフルーツジュースの摂取を禁止した。なお、生理機能や臨床検査値が正常人とかけ離れていると担当医師に診断された者、薬物や食物アレルギーがある者、薬物依存症あるいはアルコール依存症の既往歴のある者、あるいは 4 ヶ月以内に献血した者や他の治験薬の投与を受けた者は、あらかじめ除外した。

### 3. 試験プロトコール

試験 2 日前の夕方に被験者を実施施設へ入院させた。被験者に MKC-963 の 40mg 錠を 3 錠 (120mg) 1 日 2 回、朝食後 9 時、夕食後 21 時に水 100mL と共に経口投与した。なお、1 日目 (初回投与時) および 14 日目 (最終投与時) は投与後 24 時間までの採血を実施するため、朝食後 1 回のみ投与とした。投与 1、14 日目は投与後 0、0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8 時間に、投与 2、5、8 および 11 日目は投与後 0、1、2 時間に、それぞれ 4 mL の血液を静脈採血した。血液は 1,500  $\times$  g、4 で 10 分間、遠心分離し血漿を得た。得られた血漿は測定まで 20 で保存した。尿は投与前日および投与 1、2、5、8、11、14 日目に 24 時間蓄尿し尿量を記録した後、一部 (60 mL) を測定まで 20 で保存した。

本試験は北里研究所臨床薬理研究所ほうせん診療所 (Tokyo, Japan) にて実施した。試験プロトコールはヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令 (GCP)」を遵守し、ほうせん診療所治験審査委員会の審査の承認を得て実施した。また、被験者のインフォームドコンセントを書面で得た。

### 4. 血漿の前処理方法

0.5mL の血漿に内部標準物質 (IS) として d5MKC-963 を添加し、0.4 mL の titrisol バッファー (pH 9) を加え混和した後、固相抽出カラム (Extrelut-1, Merck KGaA, Damstadt,

Germany) にアプライした。カラムに吸着させた MKC-963 と IS を 5mL のジエチルエーテルで溶出させ、得られた溶出物を窒素乾固した後、残渣を 1 mL のアセトニトリルに溶解し、一部 (50  $\mu$ L) を LC/MS/MS にて測定した。

#### 5. MKC-963 の分析方法

血漿中 MKC-963 濃度は d5MKC-963 を IS として LC/MS/MS にて測定した。

分析機器： Waters HPLC system (Waters, Milford, MA, USA)  
分析カラム： Capcell Pak CN column (5  $\mu$ m, 35 mm $\times$ 4.6 mm; Shiseido)  
移動相： アセトニトリル/水/酢酸 (90/10/1, v/v/v)  
流速： 0.2 mL/min  
質量分析装置： Finnigan TSQ7000 mass spectrometer  
(Finnigan Corp., San Jose, CA, USA)  
モニターイオン： MKC-963 (m/z 332.1 m/z 222.1)  
d5MKC-963 (m/z 337.0 m/z 227.1)

検量線は 0.1 ng/mL から 50 ng/mL の範囲で直線性を確認した。0.1 ng/mL および 50 ng/mL での CV 値 (% CV) はそれぞれ 2.0% および 7.7% であり、検出下限は 0.01 ng/mL であった。検量線の範囲を超えたサンプルは、ブランク血漿で適宜希釈し、測定した。

#### 6. 薬物動態パラメーターの算出

MKC-963 の薬物動態パラメーターは WinNonlin V4.1 (Scientific Consulting, Inc, Apex, NC, USA) を用い、non-compartment model にて解析した。 $C_{max}$  (maximum plasma concentration) および  $t_{max}$  (time to reach  $C_{max}$ ) は実測値を用いた。0 から 24 時間の AUC (area under the plasma concentration-time curve) は投与直後から最終測定時間までのデータを用いて台形法により算出した。終末相の  $t_{1/2}$  (terminal half-life) はデータを log 変換した後、線形回帰分析して算出した。

#### 7. 尿中 6-OHF および F の定量

尿中 6-OHF および F の定量にはそれぞれ Stabiligen (Villers-Les-Nancy, France) および Biométreux (Marcy l'Etoile, France) のエンザイムイムノアッセイキットを使用し、それぞれ 1 mL の尿を用いて説明書通りに測定し、尿中 6-OHF/F 比を算出した。6-OHF 測定キットを用いた F の免疫交叉性は、4.4%、F 測定キットを用いた 6-OHF の免疫交叉性は、1.07% であった。

#### 8. 統計解析

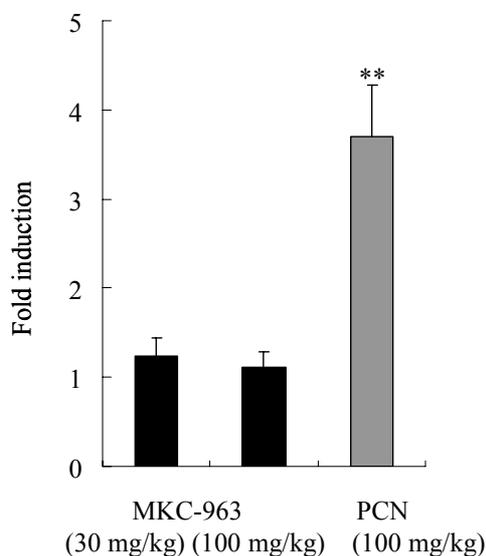
結果は means  $\pm$  S.D で記載した。Student's t-test および paired t-test は SAS software

(version 8.2, SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。P 値が 0.05 以下を統計的に有意差ありと判断した。

### 第三節 結果

#### 第一項 MKC-963 によるラット CYP3A 誘導試験

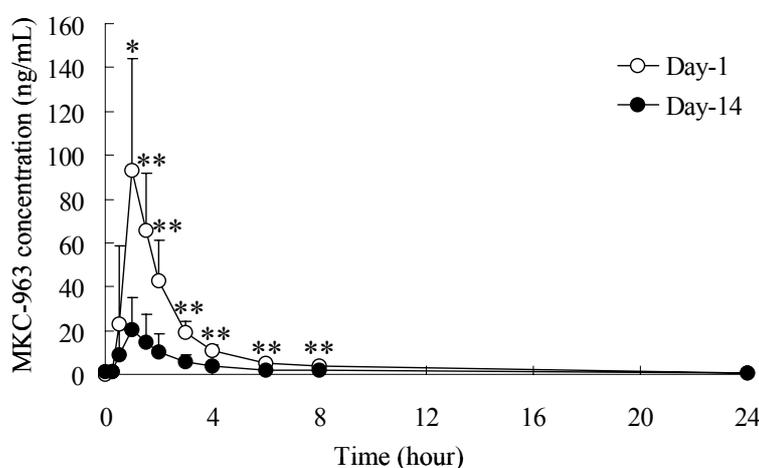
MKC-963 (30、100 mg/kg) または PCN (100 mg/kg) を 4 日間経口投与したラット肝臓より調製したミクロゾーム中のテストステロン 6 水酸化活性を Fig.2 に示した。CYP3A 活性のマーカであるテストステロン 6 水酸化活性は、ラット CYP3A の誘導剤である PCN によって有意に増加した。これに対し、MKC-963 は 30、100 mg/kg のいずれの投与量においても、テストステロン 6 水酸化活性の有意な増加は認められなかった。



**Fig. 2. Effect of MKC-963 treatment on the activity of hepatic microsomal testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation in rats.** Rats were orally treated with 30 mg/kg/day or 100 mg/kg/day of MKC-963 for 4 days. Hundred mg/kg of PCN was used as a positive control. Black and gray bars represent MKC-963 and PCN, respectively. Each value is the mean  $\pm$  SD for three animals. The mean activity of microsomal testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation in control animals was  $1.996 \pm 0.796$  nmol/min/mg protein. \*\* $p < 0.01$ .

## 第二項 健常人を対象とした MKC-963 の臨床試験

投与 1 日目、および 14 日目の MKC-963 血漿中濃度推移（平均値） および薬物動態パラメーターをそれぞれ Fig. 3、 Table 1 に示した（個々の被験者の血漿中濃度推移については Appendix 参照）。14 日目の投与後 1 時間から 8 時間までの MKC-963 血漿中濃度は、1 日目と比べ、有意に低下していた（Fig. 3）。14 日目の  $t_{max}$  および  $t_{1/2}$  は、1 日目と比較して大きな違いは認められなかったのに対し、 $C_{max}$  および AUC は、それぞれ 77%、69%減少していた（Table 1）。



**Fig. 3.** Plasma concentration-time profiles of MKC-963 on day 1 (open circles) and day 14 (closed circles) after oral administration of 120 mg to six healthy subjects. Data are expressed as means  $\pm$  SD. \* $p$  < 0.05 and \*\* $p$  < 0.01.

**Table 1.** Pharmacokinetic parameters of MKC-963 on day 1 and day 14 after repeated oral administration of 120 mg to six healthy subjects

	Day 1	Day 14
$C_{max}$ (ng/mL)	96.2 $\pm$ 46.7	22.6 $\pm$ 14.8 **
$t_{max}$ (h)	1 (1 – 1.5)	1 (0.5 – 1)
AUC (h $\times$ ng/mL)	206.0 $\pm$ 76.5	64.8 $\pm$ 31.8 **
$t_{1/2}$ (h)	7.2 $\pm$ 2.1	10.9 $\pm$ 5.0

Data are expressed as means  $\pm$  SD except for  $t_{max}$  data, which are given as median with range.

\*\* $p$  < 0.01.

投与 1、2、5、8、11 および 14 日目の投与後 1 および 2 時間の MKC-963 血漿中濃度（平均値）を Fig. 4 に示した（個々の被験者のデータは Appendix 参照）。その結果、投与後 1 時間の MKC-963 血漿中濃度は、1 日目に比べ、2 日目から有意に低下し、投与後 2 時間の MKC-963 血漿中濃度は、1 日目に比べ、5 日目から有意に低下していた。

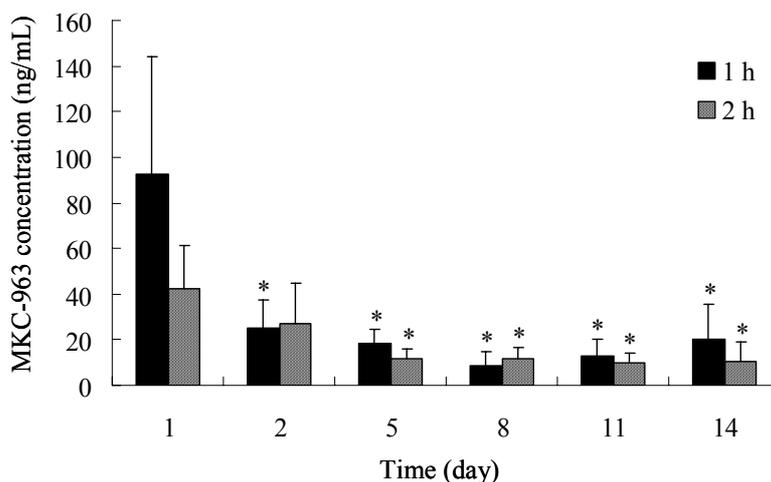


Fig. 4. Plasma concentrations of MKC-963 at 1 hour and 2 hours after oral administration of the compound (120 mg) to 6 healthy subjects on days 1, 2, 5, 8, 11 and 14. Data are expressed as means  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ .

Fig. 5 に投与前日、1、2、5、8、11 および 14 日目の尿中 6 $\beta$ -OH/F 比（平均値）の結果を示した（個々の被験者のデータは Appendix 参照）。尿中 6 $\beta$ -OH/F 比は、投与前の値に比べ、全例において 2 日目から上昇し、14 日目には 2.7 倍に達していた。

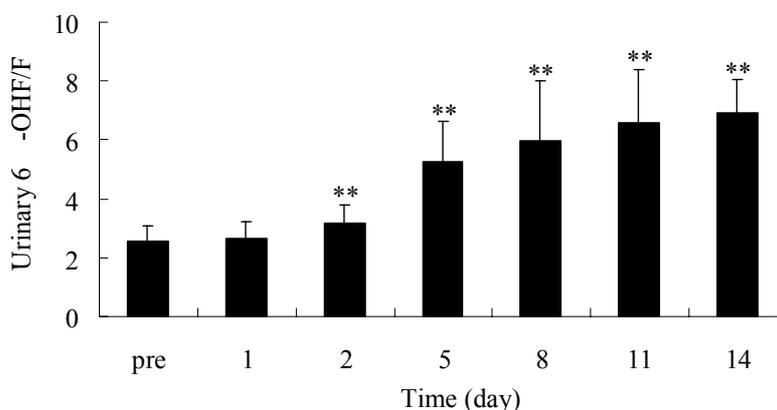


Fig. 5. Twenty-four hour urinary excretion ratios of 6 $\beta$ -hydroxy cortisol and free cortisol in six healthy subjects on the day before the start of administration and on days 1, 2, 5, 8, 11 and 14. Results are expressed as means  $\pm$  SD. \*\* $p < 0.01$ .

#### 第四節 考察

ラットを用いた CYP3A 誘導試験においては、MKC-963 による CYP3A 活性の誘導は認められなかった (Fig. 2)。これに対し、健常人を対象とした MKC-963 の臨床試験において、CYP3A の誘導マーカーである尿中 6-OHF/F の比が上昇していたことから、MKC-963 はヒトで CYP3A を誘導する可能性が示唆された (Fig. 5)。さらに、投与 14 日目の MKC-963 の  $C_{max}$  および AUC は、初日に比べ有意な低下が認められたことから (Table 1)、MKC-963 の反復投与により血漿中濃度が低下したと考えられた。また、投与 1 日目と 14 日目の  $t_{max}$  には大きな違いが認められず約 1 時間であったことから、Fig. 4 に示した投与後 1 または 2 時間の MKC-963 血漿中濃度は、各測定日の  $C_{max}$  と考えられる。したがって、MKC-963 の血漿中濃度は、2 日目から既に低下していたと考えられた。これらの結果から、MKC-963 は CYP3A の誘導剤であり、誘導された CYP3A により自身の代謝を誘導する自己誘導剤である可能性が示唆された。

一方、MKC-963 の血漿中濃度は投与 2 日目に大きく低下していたのに対し、尿中 6-OHF/F 比の大きな増加は 5 日目以降と、両者には時間的なずれが認められた。6-OHF は主として肝臓で生成すると報告されていることから [34]、尿中 6-OHF/F 比の上昇は肝臓の CYP3A 誘導を反映していると考えられる。臨床的に CYP3A の誘導が報告されているリファンピシンでも、尿中 6-OHF/F 比の大きな上昇には約一週間かかると報告され、本臨床試験結果とほぼ一致している [35, 36]。一方、CYP3A は肝臓と同様に [37, 38] 小腸でも発現していると報告され [39]、Kolars らはリファンピシン投与の 24 時間には、既に小腸の CYP3A の mRNA は誘導されると報告している [40]、Holtbecker らは、リファンピシン投与によって CYP3A の基質であるニフェジピンの代謝が誘導されるが、その代謝の誘導には小腸の寄与が大きいと報告しており [41]、Ndanusa らは、ニフェジピン投与のわずか 8 時間前にリファンピシンを投与することにより、ニフェジピンの血漿中濃度が低下すると報告している [42]。以上のことから、リファンピシンは投与後すみやかに小腸の CYP3A を誘導するのに対し、肝臓の CYP3A の誘導は数日遅れるものと考えられる。したがって、MKC-963 の血漿中濃度低下と尿中 6-OHF/F 比の上昇に時間的なずれが生じたのは、リファンピシンと同様に、MKC-963 が小腸の CYP3A を投与 2 日目には既に誘導していたのに対し、肝臓の誘導は数日遅れたためである可能性が考えられた。

## 第五節 小活

1. ラットを用いた MKC-963 による CYP3A 誘導試験の結果、CYP3A の有意な増加は認められなかった。
2. 健常人を対象とした MKC-963 の臨床試験の結果、以下の知見が得られた。
  - a) 投与 14 日目における MKC-963 の  $C_{max}$  および AUC は、初日に比べ、それぞれ 77%、69% 減少していた。
  - b) MKC-963 の  $C_{max}$  と推察される投与後、1、2 時間の血漿中濃度は、投与 2 日目から既に減少していた。
  - c) 尿中 6-OHF/F 比は投与 2 日目から上昇し、14 日目には投与前の 2.7 倍に増加したことから、CYP3A の誘導が示唆された。

以上の結果から、MKC-963 はラットでは CYP3A の誘導は起こさないが、ヒトでは起こすことが示された。すなわち、MKC-963 による CYP3A の誘導にはラットとヒトで種差が存在する可能性が示唆された。さらに、MKC-963 の投与により、ヒトでは MKC - 963 自身の血漿中濃度も低下したことから、MKC-963 は自己誘導剤である可能性も示唆されたが、MKC-963 が CYP3A の基質となるか否かについては、さらなる検討が必要と考えられた。

## 第二章 ヒト肝初代培養系およびヒト CYP 分子種発現系を用いた MKC-963 による自己誘導に関する検討

### 第一節 序文

第一章に記したように、MKC-963 は健常人を対象とした臨床試験において、尿中 6 $\beta$ -OH/F 比を上昇させ、さらに MKC-963 自身の血漿中濃度も低下したことから自己誘導剤である可能性が示唆された。

ヒト肝初代培養系を用いた CYP3A 誘導試験や化合物の代謝に関与する CYP 分子種の推定は、MKC-963 の臨床試験を実施していた当時は困難であったが、現在では比較的容易に実施することができる *in vitro* 実験である。ヒト肝初代培養系は、臨床的に CYP3A 誘導を起こすことが知られているリファンピシン、フェノバルビタール、フェニトイン、トログリタゾンなどにより、CYP3A の mRNA や活性のマーカーであるテストステロン 6 $\beta$  水酸化活性が誘導される [7, 8, 9, 10]。さらに、ヒト肝細胞は凍結保存が可能であり、凍結した細胞を融解して用いても、新鮮肝細胞と同様に CYP3A 誘導試験に利用可能であると報告されている [43]。そこで、MKC-963 が CYP3A4 の mRNA およびテストステロン 6 $\beta$  水酸化活性を誘導するか否かを、リファンピシンを陽性対照として、凍結ヒト肝細胞を用いた CYP3A 誘導試験により検討した。

一方、化合物の代謝に関与するヒト CYP 分子種を肝マイクロゾームやヒト CYP 発現系を用いることにより推定することが可能となっている [11, 12]。そこで、MKC-963 が CYP3A4 の基質となるか否かを検討するために、薬物代謝に重要と考えられているヒト CYP 分子種 (CYP3A4、2D6、2C19、2C9、1A2) の発現系マイクロゾームを用いてクリアランスを求め、Rodrigues らの報告しているヒト肝マイクロゾーム中での含量 [44] で補正することにより、MKC-963 代謝への CYP3A4 の寄与率を推定し、MKC-963 が CYP3A4 の基質となるか否かを検討した。

### 第二節 方法

#### 1. 試薬

Rifampicin は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。MKC-963、testosterone および 6 $\beta$ -hydroxytestosterone は、第一章と同様のものを使用した。その他の試薬は特級を用いた。

## 2. 初代ヒト肝細胞の培養

凍結ヒト肝細胞 (Lot 100, 女性、コーカシアン、74 歳) は In Vitro Technologies, Inc. (Baltimore, MD, USA) より入手した。凍結ヒト肝細胞は融解した後、Hepatocyte Culture Medium (Cambrex, Walkersville, MD, USA) を加え、50 × g、4 で 3 分間遠心分離した。沈殿した細胞を Hepatocyte Culture Medium に溶解し、トリパンプルー染色にて生存率を求めた。細胞の生存率は 80% 以上であった。細胞は  $1.5 \times 10^5$  cells/well の細胞濃度でマトリゲルコートした 24 ウェルプレートに播種し、37 の CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。

## 3. 化合物の暴露

4 日間の予備培養を行ったヒト肝細胞に、dimethyl sulfoxide (DMSO)、MKC-963 または陽性対照であるリファンピシンを 4 日間 (96 時間) 暴露した。MKC-963 およびリファンピシンの添加濃度はそれぞれ 0.25 μM および 10 μM とし、溶媒の DMSO 濃度は最終濃度で 0.2% となるように添加した。なお、MKC-963 および rifampicin の保存溶液は DMSO で調製し、使用直前に希釈した。

## 4. RNA 抽出およびリアルタイム PCR による CYP3A4 の mRNA 発現量の測定

肝細胞からの total RNA 抽出は Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用い、得られた total RNA は使用時まで -80 で保存した。ランダムヘキサマーおよび Superscript II Transcription system (Invitrogen) を用いて、total RNA (1 ug) から cDNA を合成した。mRNA の定量はリアルタイム PCR 法にて行った。CYP3A4 および  $\beta$ -アクチンに特異的なプライマー、プローブセットは Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて、それぞれの遺伝子配列からデザインした。プライマー、プローブの配列は以下の通りである (5' 3')、

CYP3A4 : forward primer (GCA GGA GGA AAT TGA TGC AGT T)、fluorogenic probe (FAM- ATA AGG CAC CAC CCA CCT A- MGB)、reverse primer (CTG AGC GTT TCA TTC ACC ACC)

-actin : forward primer (CCT GGC ACC CAG CAC AAT)、fluorogenic probe (VIC- ATC ATT GCT CCT CCT GAG- MGB)、reverse primer (CCG ATC CAC ACG GAG TAC TTG)

リアルタイム PCR は PRISM 7900 Sequence Detection system (Applied Biosystems) を用いて実施し、PCR 条件は 50 を 2 分、95 で 10 分間反応させた後、95 を 15 秒、60 を 1 分、の反応を 40 サイクルとした。CYP3A4 の mRNA 発現量は、 $\beta$ -アクチンの mRNA 発現量で除し、補正した。

## 5. CYP3A4 の活性測定

ヒトヘパトサイトの CYP3A4 活性は Donato らの報告 [45] を参考に、24 ウェルプレートに培養した生細胞を用いて測定した。化合物を暴露した細胞に、250 μM の testosterone (基質) を添加して 30 分間インキュベートし、培養液中に生成した

6 -hydroxytestosterone を第一章と同様に測定した。

#### 6. ヒト CYP 分子種発現系を用いた MKC-963 の代謝

CYP 分子種発現系マイクロゾームは、Supersomes (Gentest, Woburn, MA, USA) を用いた。1 mM NADP<sup>+</sup>、8 mM glucose-6-phosphate、1 IU/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase、6 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 mM EDTA を含む反応溶液 (リン酸バッファー、pH 7.4) に MKC-963 (2 μM) と、CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 または CYP3A4 の CYP 分子種発現系マイクロゾーム (50 pmol/mL) を加え、37 °C で 0、5、15、30 分間インキュベートした。各時点の反応溶液中の MKC-963 を LC/MS にて定量し、反応 0 分を 100%として残存率を算出した。

#### 7. 分析条件

反応液中の MKC-963 濃度は以下の条件で LC/MS により測定した。

分析機器：	Waters Alliance 2795 (Waters, Milford, MA, USA)	
分析カラム：	XTerra MS C18 (3 μm, 30 mm×2.1 mm; Waters)	
移動相 A：	10mM ammonium acetate in acetonitrile/water(9/1)	
移動相 B：	10mM ammonium acetate in water	
グラジエント：	Time (min)	B(%)
	1	90
	3	10
	3.5	90
流速：	1 mL/min	
質量分析装置：	Waters ZQ2000 (Waters)	
モニターイオン：	MKC-963 (m/z 332.1)	

#### 8. ヒト CYP 分子種による MKC-963 代謝への寄与率の推定

CYP 分子種の *in vitro* クリアランス (CL<sub>enzyme</sub>) を以下の計算式で求めた。

$$CL_{enzyme} (\mu L/min/pmol P450) = - slope (1/min) / CYP concentration (pmol CYP/mL) \times 1000$$

なお、slope は Obach [ 46 ] らの報告を参考に、MKC-963 の log%と反応時間の線形回帰分析により求めた。

CL<sub>enzyme</sub> は Rodrigues [ 44 ] らの報告したヒト肝マイクロゾーム中の存在比を用いて以下の計算式により補正した。

$$Corrected CL_{enzyme} = CL_{enzyme} \times enzyme\ content$$

以上の結果を用いて CYP 分子種の寄与率は以下の計算式にて算出した。

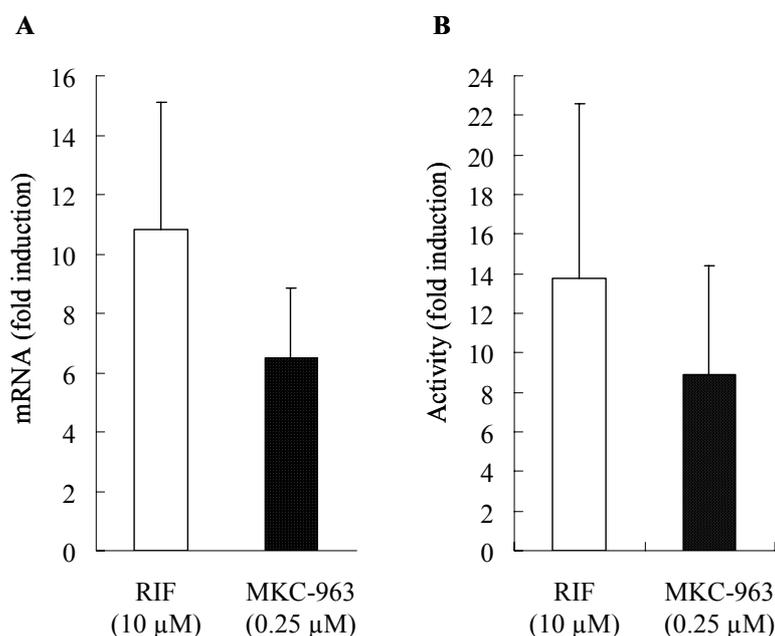
$$\text{Contribution of each CYP enzyme (\%)} = \frac{\text{corrected CL}_{\text{enzyme}} \text{ for each enzyme}}{\text{sum of corrected CL}_{\text{enzyme}}} \times 100$$

#### 9. 統計解析

統計解析は第一章と同様に実施した。

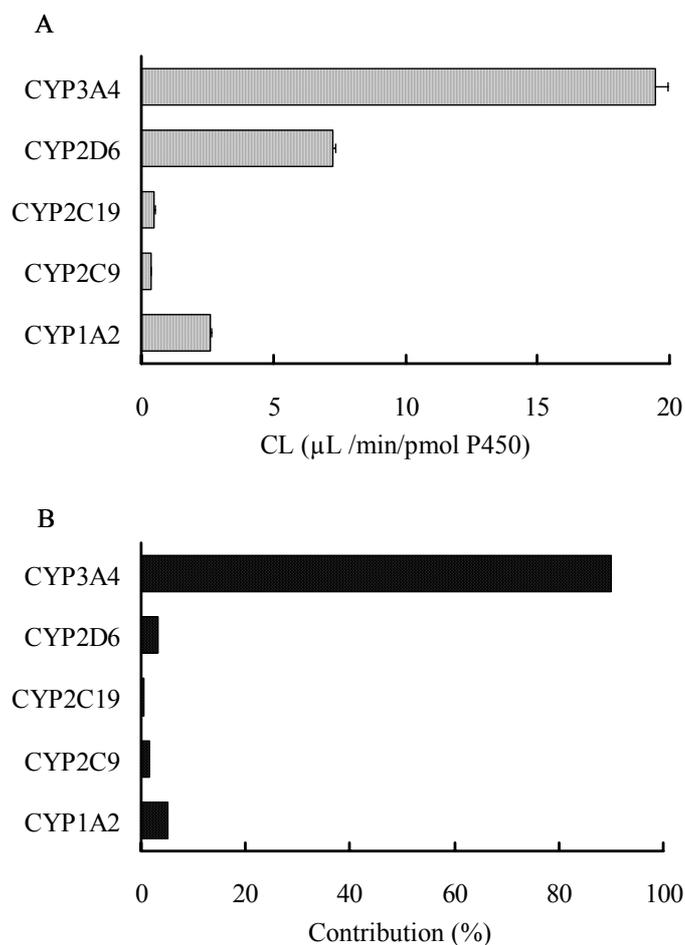
### 第三節 結果

ヒト肝初代培養系を用いて、MKC-963 (0.25  $\mu\text{M}$ ) の CYP3A4 に対する影響を検討したところ、MKC-963 は CYP3A4 の mRNA を約 6 倍に、テストステロン 6 水酸化活性を約 9 倍誘導した (Fig. 6A、6B)。これは陽性対照として用いたリファンピシン (10  $\mu\text{M}$ ) で認められた誘導倍率 (CYP3A4 mRNA 発現量を約 11 倍、テストステロン 6 水酸化活性を約 14 倍) に近い値であった。



**Fig. 6. Effects of rifampicin (10  $\mu\text{M}$ ) and MKC-963 (0.25  $\mu\text{M}$ ) on CYP3A4 mRNA (A) and activity of testosterone 6 $\beta$ -hydroxylation in primary human hepatocyte cultures (B).** Total RNA was extracted, and CYP3A4 and  $\beta$ -actin mRNA levels were measured by real-time PCR methods as described in the Materials and Methods section, and then CYP3A4 mRNA was normalized to  $\beta$ -actin and compared with that of a vehicle control. The mean absolute ratio for the control hepatocytes was  $0.051 \pm 0.02$ . (A). For measurement of CYP3A4 activity, testosterone was incubated with intact hepatocytes and metabolite was analyzed as described in the Materials and Methods section, and then CYP3A4 activities were compared with those of a vehicle control. The mean activity of control hepatocytes was  $2.3 \pm 0.7$  pmol/min/ $10^5$  cells (B). Results are expressed as means  $\pm$  SD of three experiments.

CYP3A4、2D6、2C19、2C9、1A2 の MKC-963 に対するクリアランスは、それぞれ、19.5、7.3、0.5、0.4、2.6 (  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{pmol P450}$  ) であった ( Fig. 7A )。これら分子種の肝ミクロゾーム中の存在量は異なるため、クリアランスの結果をそれぞれの含量で補正すると、MKC-963 代謝の約 90% は CYP3A4 が寄与していると推定された ( Fig. 7B )。



**Fig. 7. Metabolic clearance of MKC-963 in microsomes from insect cells expressing CYP enzymes (50 pmol/mL) (A) and the contributions (%) of each CYP enzyme to the total clearance of MKC-963 in five CYP enzymes corrected by the CYP contents in native human liver microsomes as described in the Materials and Methods section (B).** MKC-963 (2  $\mu\text{M}$ ) was incubated in the presence of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 or CYP3A4 for 0, 5, 15 and 30 min, at 37 °C. Each value is the mean  $\pm$  SD of triplicate assays.

#### 第四節 考察

ヒト肝初代培養系を用いた CYP3A 誘導試験およびヒト CYP 分子種発現系による代謝酵素の推定の結果、MKC-963 は CYP3A4 を誘導し、MKC-963 自身も CYP3A4 の基質となると考えられた。これらの結果と第一章に記した健常人を対象とした臨床試験で認められた MKC-963 の血漿中濃度の低下および尿中 6-OHF/F 比の上昇を併せて考えると、MKC-963 は CYP3A4 の誘導剤であり、さらに自身の代謝を誘導する自己誘導剤であると考えられた。一方、今回検討は行わなかったが、CYP3A5 は CYP3A4 と基質特異性が類似し [47] ヒト肝初代培養系でリファンピシンにより誘導されることから [48]、CYP3A5 も CYP3A4 と同様に MKC-963 による自己誘導に関与している可能性が考えられる。しかしながら、CYP3A4 と比較して、CYP3A5 の肝臓や小腸における酵素活性や含量は低く [44, 47]、リファンピシンによる CYP3A5 の誘導も低いことから [48]、CYP3A5 が MKC-963 の自己代謝誘導に主要な酵素として関与している可能性は低いものと考えられた。

ヒト肝初代培養系を用いた誘導試験では、化合物の濃度設定が重要である [49]。本章で用いた薬物の添加濃度は、*in vivo* で誘導が示唆された時の  $C_{max}$  (リファンピシンは文献値 [13, 49]、MKC-963 は第一章に記載した投与初日の濃度) を指標として決定した。この濃度下において、MKC-963 はリファンピシンに近いレベルまで CYP3A4 を誘導したことから、MKC-963 はリファンピシンに匹敵する強力な CYP3A の誘導剤であると評価することができた。しかし、通常、臨床試験前にはヒトにおける血漿中濃度は不明であり、今回のように  $C_{max}$  を指標に濃度設定することは困難である。従って、ヒト肝初代培養系を用いた CYP3A の誘導評価には、動物実験データからのアニマルスケールアップや [50, 51]、*in vitro* データからの *in vivo* への外挿 [52, 53] が重要になってくるものと考えられた。

## 第五節 小活

1. ヒト肝初代培養系を用いて MKC-963 が CYP3A4 に与える影響を検討したところ、CYP3A4 の mRNA 量および酵素活性が、それぞれ約 6 倍、9 倍に増加していた。これは、陽性対照としたリファンピシンの誘導率（それぞれ約 11 倍、14 倍）に近い値であった。
2. ヒト CYP 分子種発現系を用いて MKC-963 の代謝クリアランスを測定したところ、高い順に CYP3A4、2D6、1A2 であり、2C9 および 2C19 は低かった。この結果をヒト肝ミクロゾーム中の各分子種の含量で補正した結果、MKC-963 代謝の約 90%は CYP3A4 の寄与であると推定された。

以上の結果から、MKC-963 は CYP3A4 を誘導し、MKC-963 自身も CYP3A4 の基質であることが示された。これらの結果と、健常人を対象とした臨床試験の結果を併せて考えると、MKC-963 は CYP3A4 の誘導剤であり、さらに自身の代謝を誘導する自己誘導剤であると考えられた。

### 第三章 MKC-963 によるヒトおよびラット PXR 活性化の種差に関する検討

#### 第一節 序文

第一章において、MKC-963 による CYP3A 誘導にはヒトとラット間で種差が存在することが示唆された。CYP3A 誘導の種差は、発現調節因子である Pregnane X Receptor (PXR) の活性化の種差に起因すると報告されている [13, 14, 15]。PXR は N 末に DNA 結合領域 (DBD)、C 末にリガンド結合領域 (LBD) を持つ核内受容体である [13, 16, 17, 18]。ヒトおよびラット PXR の DBD は 96% の相同性があるのに対し、LBD の相同性は 76% と低く [14, 19]、リファンピシンは、ヒト PXR を活性化するがラット PXR を活性化しないため、ヒトで CYP3A を誘導するのに対しラットの CYP3A を誘導しないと報告されている [14, 15]。MKC-963 による CYP3A 誘導にも、リファンピシンのように、ヒトとラット間で種差が存在することから、この原因も MKC-963 による PXR 活性化にヒトとラット間で種差が存在するためである可能性が考えられる。そこで、本章では、MKC-963 によるヒトおよびラットの PXR 活性化についてレポーター遺伝子アッセイを用いて測定し、MKC-963 による CYP3A 誘導の種差が PXR 活性化の種差に起因するか否かについて検討した。

#### 第二節 方法

##### 1. 試薬

MKC-963、Rifampicin および PCN は第一章および第二章と同様のものを用いた。その他の試薬は特級を用いた。

##### 2. プラスミド

ラット PXR の open reading frame は、ラット肝 cDNA ライブラリーより、NCBI の配列データ (accession no. NM\_052980) をもとに作成したプライマー (forward primer : 5'-GAT GTA AAC CTG GAG ATG AGA CC-3'、reverse primer : 5'-AGA TCT GGG TCT GGC TGC TCC GT-3') を用いて、PCR 法にて作成した。得られた PCR 産物は pCR-Blunt II-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) へ組み込み、EcoRI を用いて pTarget vector (Promega, Madison, WI, USA) にクローニングし、ラット PXR 発現ベクター (pTarget-rPXR) を得た。ヒト PXR 発現ベクター (pTarget-hPXR) および CYP3A4 レポーターベクター (pGL3-XREM/prPXRE) は Kobayashi らの報告 [54] したのものを用いた。

### 3. 細胞培養およびレポーター遺伝子アッセイ

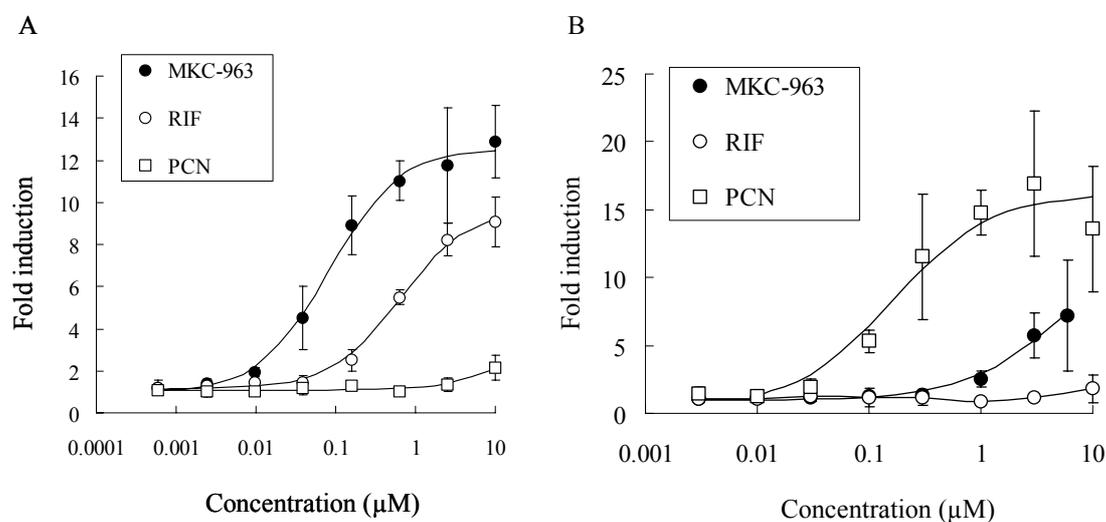
HepG2 および H-4-II-E 細胞は大日本住友製薬株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。細胞は 10% fetal calf serum を添加した MEM-Earle's medium を用いて、96 ウェルプレートで培養した。1 日の予備培養の後、pGL3-XREM/prPXR (100 ng/well)、pTarget-hPXR (50 ng/well) および phRL-TK Vector (20 ng/well) を lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) を用いて、Hep G2 細胞にトランスフェクトした。H-4-II-E 細胞へのトランスフェクションも pTarget-hPXR の代わりに pTarget-rPXR とした以外は同様に実施した。トランスフェクトした翌日に MKC-963、リファンピシンおよび PCN を培地に添加した (ヒト PXR には 0.6 nM ~ 10  $\mu$ M、ラット PXR には 3 nM ~ 10  $\mu$ M)。化合物は dimethyl sulfoxide (DMSO) 溶液として調製し、最終濃度で 0.2% (v/v) となるように培地に添加した。溶媒対照群には等量の DMSO を添加した。ルシフェラーゼ活性は Dual-Luciferase reporter assay system (Promega) または、Dual-Glo Luciferase reporter assay system (Promega) を用いて Tecan plate reader GENios (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austria) にて測定した。活性値はサンプルベクターである firefly luciferase の活性 (pGL3-XREM/prPXR) を、コントロールベクターである renilla luciferase の活性 (phRL-TK, Promega) の比とすることにより補正した。誘導率は溶媒対照群を 1 として算出した。EC<sub>50</sub> 値の算出には WinNonlin software (version 4.1, Pharsight Corp., Cary, NC, USA) を用いた。

### 第三節 結果及び考察

Fig. 8A および Table 2 に、MKC-963、リファンピシン、PCN によるヒト PXR の活性化をレポータージーンアッセイにて測定した結果を示した。MKC-963 はヒト PXR を濃度依存的に活性化し、その  $EC_{50}$  値は 83 nM であった。リファンピシンもヒト PXR を活性化し、その  $EC_{50}$  値は 642 nM であったが、PCN はヒト PXR をほとんど活性化しなかった。リファンピシンがヒト PXR を活性化することはこれまでも報告されており、Lehmann や Brobst らの求めた  $EC_{50}$  値は約 800 nM、Östberg らの求めた  $EC_{50}$  値は 740 nM であり、本検討結果とよく一致していた [13, 21, 55]。一方、PCN はヒト PXR を活性化しないと報告され、本検討においても同様であった [14]。

Fig. 8B および Table 2 には、MKC-963、リファンピシン、PCN によるラット PXR の活性化をレポータージーンアッセイにて測定した結果を示した。MKC-963 は高濃度でラット PXR を活性化し、その  $EC_{50}$  値は 5.4  $\mu$ M であった。PCN はラット PXR を低濃度から活性化し、その  $EC_{50}$  値は 0.16  $\mu$ M であったが、リファンピシンはラット PXR をほとんど活性化しなかった。Jones らもリファンピシンはラット PXR を活性化せず、PCN はラット PXR を活性化すると報告しており [14]、本検討結果とよく一致していた。

以上の結果から、MKC-963 はヒト PXR を強力に活性化するが、ラット PXR に対する活性化作用は弱いことが明らかとなった。これらの結果は、MKC-963 がヒトの CYP3A を誘導するが、ラットの CYP3A を誘導しないという結果とよく一致し、MKC-963 による CYP3A 誘導のヒトとラット間での種差は、MKC-963 による PXR の活性化の違いに原因がある可能性が強く示唆された。



**Fig. 8.**

**(A) Effects of MKC-963, rifampicin and PCN on human PXR-mediated transactivation.** Constructs pTarget-hPXR (50 ng/well) and pGL3-XREM/prPXRE (100 ng/well) were transiently transfected into HepG2 cells. The cells were treated with 0.6 nM to 10 µM of each compound for 24 h, and cell extracts were subsequently assayed for luciferase activity. Each value is the mean ± SD of at least three experiments.

**(B) Effects of MKC-963, PCN and rifampicin on rat PXR-mediated transactivation.** Constructs pTarget-rPXR (50 ng/well) and pGL3-XREM/prPXRE (100 ng/well) were transiently transfected into H-4-II-E cells. The cells were treated with 3 nM to 10 µM of rifampicin and PCN for 24 h. MKC-963 was used at a concentration of 6 µM instead of 10 µM because of its cell toxicity. Cell extracts were subsequently assayed for luciferase activity. Each value is the mean ± SD of at least three experiments.

**Table 2. EC<sub>50</sub> values of human and rat PXR activation by MKC-963, rifampicin and PCN**

	human PXR	rat PXR
MKC-963	83 nM	5.4 µM
rifampicin	642 nM	n.d.
PCN	n.d.	0.16 µM

n.d., not determined.

#### 第四節 小活

- 1 . MKC-963 によるヒト PXR の活性化について、レポータージーンアッセイを用いて検討したところ、MKC-963 はヒト PXR を活性化し、その  $EC_{50}$  値は 83 nM であった。ヒト PXR のリガンドであるリファンピシンもヒト PXR を活性化し、その  $EC_{50}$  値は 642 nM であったが、ラット PXR のリガンドである PCN はヒト PXR をほとんど活性化しなかった。
- 2 . MKC-963 によるラット PXR の活性化について、レポータージーンアッセイを用いて検討したところ、高濃度でラット PXR を活性化させ、その  $EC_{50}$  値は 5.4  $\mu$ M であった。PCN はラット PXR を活性化し、その  $EC_{50}$  値は 0.16  $\mu$ M であったが、リファンピシンはラット PXR をほとんど活性化しなかった。

以上の結果から、MKC-963 はヒト PXR を強力に活性化するが、ラット PXR に対する活性化作用は弱いことが明らかとなった。これらの結果は、MKC-963 がヒトの CYP3A を誘導するが、ラットの CYP3A を誘導しないという結果とよく一致し、MKC-963 による CYP3A 誘導のヒトとラットにおける種差は、MKC-963 による PXR の活性化の違いに原因がある可能性が強く示唆された。

## 第四章 MKC-963 によるヒトおよびラット PXR 活性化の種差に関するアミノ酸残基の推定

### 第一節 序文

第三章での検討により、MKC-963 はヒト PXR を活性化するが、ラット PXR の活性化は弱いことが明らかとなり、MKC-963 による PXR の活性化にはヒトとラット間で種差が存在することが示唆された。PXR 活性化の種差は、リガンド結合領域 (LBD) のアミノ酸配列の種差に起因することがいくつかの化合物で報告されている [14, 19]。例えばリファンピシンとヒト PXR-LBD との共結晶構造を X 線で解析することにより、リファンピシンがヒト PXR と相互作用するアミノ酸が推定されている [20]。さらにリファンピシンがヒト PXR と相互作用するアミノ酸をラット PXR のアミノ酸へ置換することにより、リファンピシンによる PXR の活性化が消失することから、リファンピシンによるヒトとラット PXR 活性化の種差は、相互作用するアミノ酸残基の種差によると推定されている [21, 22]。したがって、MKC-963 による PXR 活性化の種差も、MKC-963 がヒト PXR と相互作用するアミノ酸に、ラット PXR と相違があったために生じた可能性が考えられる。そこで、MKC-963 がヒト PXR と相互作用するアミノ酸を推定し、ラット PXR のアミノ酸配列と比較することにより、MKC-963 によるヒトおよびラット PXR 活性化の種差について考察することを目的とし、本章では以下の検討を実施した。即ち、リファンピシン、Hyperforin、SR12813 との水素結合が報告されている 3 種のアミノ酸 (Ser247、Gln285、His407) に着目し [20, 56, 57, 58] Ser247、Gln285、His407 を水素結合を形成しないアラニンまたはイソロイシンに置換した PXR のアミノ酸変異体を作成し、MKC-963 によるヒト PXR の活性化にもこれらアミノ酸が関与するか否かについて、レポータージーンアッセイを用いて検討した。一方、ヒト PXR の X 線結晶構造は Protein Data Bank (PDB) に登録されていることから、その X 線結晶構造を用いた分子力場計算により、MKC-963 との結合様式の推定が可能と考えられる [59, 60]。そこで、Ser247、Gln285、His407 以外に MKC-963 が相互作用するアミノ酸を推定するためにヒト PXR の X 線結晶構造 (1NRL) を用いた分子力場計算により、MKC-963 とヒト PXR-LBD との結合様式を推定した。次に得られた結合様式から MKC-963 がヒト PXR と相互作用するアミノ酸を推定し、ラット PXR のアミノ酸と比較することにより、MKC-963 によるヒトおよびラット PXR の種差に重要なアミノ酸残基について検討した。

### 第二節 方法

#### 1. 試薬

MKC-963 および rifampicin は第一章、第二章と同様のものを用いた。その他の試薬は特

級を用いた。

## 2. プラスミド

レポータープラスミド ( pGL3-XREM/prPXRE ) およびヒト PXR 発現プラスミド ( pTarget-hPXR ) は第三章と同様のものを使用した。Site-directed mutagenesis は以下のように実施した。pTarget-hPXR を template とし、以下の primer を用いて KOD-plus DNA polymerase ( Toyobo, Osaka, Japan ) にて PCR 反応を行った。S247A ; 5' - GAA CAT GTA GGT TGC CAT GTC AGC CAT GTG -3' ( forward ) および 5' - CAC ATG GCT GAC ATG GCA ACC TAC ATG TTC -3' ( reverse ) Q285I ; 5' - GTG TTG AAT CTC AGT ATA CAC AGC TCG AAA GC -3' ( forward ) および 5' - GCT TTC GAG CTG TGT ATA CTG AGA TTC AAC AC -3' ( reverse ) H407A ; 5' - CAG CAG CCG CTG GGT GGC CTG AGC ATT GAT GCT G -3' ( forward ) および 5' - CAG CAT CAA TGC TCA GGC CAC CCA GCG GCT GCT G -3' ( reverse ) 。 PCR 産物を精製し、template を除くために DpnI ( New England BioLabs, Hitchin, Herfordshire, UK ) で処理することにより変異体プラスミド DNA ( pTarget-hPXR/S247A、pTarget-hPXR/Q285I および pTarget-hPXR/H407A ) を得た。変異体の塩基配列はシーケンスにて確認した。

## 3. 細胞培養およびレポータージーンアッセイ

ヒト肝ガン由来細胞である FLC7 細胞 [ 61 ] は杏林大学の永森静志教授よりご恵与賜った。細胞培養は、10% fetal calf serum を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 を用いて、24 ウェルプレートで培養した。1 日の予備培養の後、pGL3-XREM/prPXRE ( 200 ng/well )、PXR 発現ベクター [ pTarget-hPXR ( wild )、pTarget-hPXR/S247A、pTarget-hPXR/Q285I または pTarget-hPXR/H407A ] ( 10 ng/well ) および phRL-TK vector ( 4 ng/well ) を TransIT ( Mirus, Madison, WI, USA ) を用いて細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトした 24 時間後にリファンピシン ( 5  $\mu$ M ) または MKC-963 ( 0.1, 0.3, 1  $\mu$ M ) を培地に添加した。化合物は dimethyl sulfoxide ( DMSO ) 溶液として調製し、最終濃度で 0.1% ( v/v ) となるように培地に添加した。溶媒対照群には等量の DMSO を添加した。ルシフェラーゼ活性は Dual-Luciferase reporter assay system ( Promega, Madison, WI, USA ) を用いて TD-20/20 Luminometer ( Turner Designs, Sunnyvale, CA, USA ) にて測定した。活性値はサンプルベクターである firefly luciferase の活性 ( pGL3-XREM/prPXRE ) を、コントロールベクターである renilla luciferase の活性 ( phRL-TK, Promega ) の比とすることにより補正した。誘導率は溶媒対照群を 1 として算出した。

## 4. ヒト PXR-LBD の X 線結晶構造を用いた分子力場計算

計算には Watkins らによって報告された X 線共結晶構造 ( PDB entry 1NRL ) を用いた [ 57 ]、hPXR-LBD と MKC-963 の複合体構造に対する molecular mechanics ( MM ) calculations は以下の手順で行った。1) MKC-963 を hPXR-LBD 内に配置し、2) 水分子 ( TIP3P model ) [ 62 ]

を Monte Carlo method [ 63 ] にて周囲 15 に発生させた。構築した複合体構造に対して MM calculations を実施後、MKC-963 と hPXR-LBD の相互作用を調べた。

## 5. 使用ソフトウェア

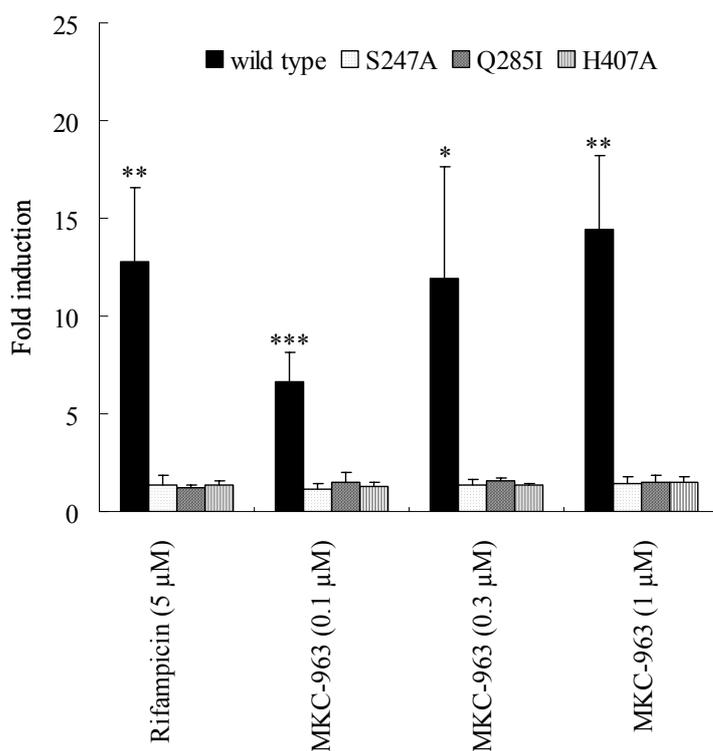
MM calculations には AMBER 7.0 [ 64 ] を用いた。MKC-963 の Point charges は AMBER 7 に付属している RESP program を使用した。RESP に入力する electrostatic potentials は、Gaussian 98 [ 65 ] を用いて算出した。用いた基底関数系は 6-31G\*\* である。point charges および vdW parameters には、それぞれ AMBER standard residue database と AMBER Force Field Parameter ( parm99.dat ) を使用した。この条件で最適化した MKC-963 と hPXR-LBD の複合体結合様式を Fig. 10 に示した。

## 6. 統計解析

第一章と同様に実施した。

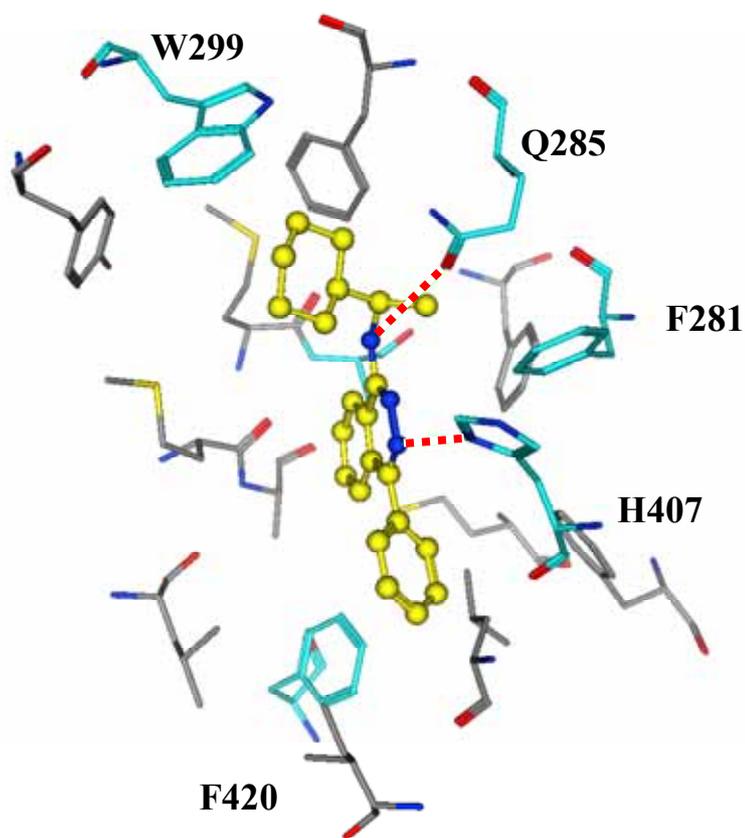
### 第三節 結果

Fig. 9 に野生型および変異体ヒト PXR (S247A、Q285I または H407A) を用いたレポーター遺伝子アッセイの結果を示した。リファンピシン(5  $\mu$ M) は野生型ヒト PXR を活性化したが、変異体 PXR は活性化しなかった。同様に、MKC-963 (0.1、0.3、1  $\mu$ M) も野生型ヒト PXR を活性化していたのに対し、変異体 PXR を活性化しなかった。



**Fig. 9. Effects of rifampicin (5  $\mu$ M) or MKC-963 (0.1, 0.3 and 1  $\mu$ M) on human wild and mutated PXR-mediated transactivation.** Constructs pGL3-XREM/prPXRE (200 ng/well) and each pTarget vector (pTarget-hPXR, pTarget-hPXR/S247A, pTarget-hPXR/Q285I or pTarget-hPXR/H407A, 10 ng/well) were transiently transfected into FLC7 cells. The cells were treated with the indicated concentration of each compound for 24 h, and cell extracts were subsequently assayed for luciferase activity. Each value is the mean  $\pm$  SD of at least three experiments. \*\*\* $p$  < 0.005, \*\* $p$  < 0.01 and \* $p$  < 0.05.

Fig. 10 にヒト PXR-LBD の X 線結晶構造を用いた分子力場計算より推定した MKC-963 とヒト PXR-LBD との結合様式を示した。この結合様式から、MKC-963 は H407 と水素結合、Q285 と弱い水素結合をしている他に、F281、F420 および W299 と疎水的な相互作用を形成していると考えられた。しかしながら、MKC-963 と S247 との相互作用は認められなかった。



**Fig. 10. MKC-963 docked into the PXR ligand binding domain.** Theoretical calculations for construction of a complex structure are described in Materials and Methods. MKC-963 is shown in yellow. H407, Q285, F281, F420 and W299 are shown in cyan.

#### 第四節 考察

MKC-963 がヒト PXR と相互作用するアミノ酸をラット PXR のアミノ酸配列と比較することにより、MKC-963 によるヒトおよびラット PXR 活性化の種差について考察するために、MKC-963 がヒト PXR と相互作用するアミノ酸残基の推定を実施した。MKC-963 によるヒト PXR のアミノ酸変異体 (S247A、Q285I、H407A) の活性化について、レポータージーンアッセイを用いて検討したところ、いずれの変異体でも有意な活性化は認められなかった。この結果は、リファンピシンと同様であり、他の報告とほぼ一致していたことから [ 20, 21 ]、S247、Q285 および H407 のアミノ酸は、MKC-963 による PXR の活性化にも必須であると考えられた。ヒト PXR-LBD の X 線結晶構造を用いた分子力場計算より推定した MKC-963 とヒト PXR-LBD との結合様式から、MKC-963 が相互作用するアミノ酸残基を推定したところ、MKC-963 は Q285、H407 と水素結合を形成した他に、F281、F420 および W299 と疎水的な相互作用をしていると考えられたが、S247 との相互作用は認められなかった。以上の結果を併せて考えると、MKC-963 はヒト PXR の Q285 および H407 と 2 つの水素結合を形成していると推定されたが、Q285、H407 のどちらか一方を置換した PXR アミノ酸変異体においても、MKC-963 による活性化が消失したことから、MKC-963 によるヒト PXR の活性化には 2 つの水素結合の維持が必須であると考えられた。MKC-963 が相互作用すると推定されたアミノ酸をラット PXR と比較すると、Q285 と H407 のみが異なっており、ラット PXR ではそれぞれ I282 と Q404 であった [14, 19]。イソロイシンの側鎖は水素結合を形成しないことから、MKC-963 はラット PXR と 2 つの水素結合を維持できないと考えられ、そのために MKC-963 はラット PXR の活性化が弱いものと考えられた。したがって、MKC-963 によるヒトおよびラット PXR の活性化の種差は、Q285 および H407 のアミノ酸残基の相違が一因となっている可能性が示唆された。

MKC-963 によるヒト PXR 活性化には S247 も必須であったが (Fig. 9)、ヒト PXR-LBD の X 線結晶構造を用いた分子力場計算からは、MKC-963 と S247 の相互作用は認められず (Fig. 10)、2 つの結果に相違が認められた。この原因は明らかではないが、S247 はほとんどの脊椎動物の PXR で保存されているアミノ酸残基であることから [ 66 ] S247 をアラニンに置換したことにより PXR の構造が変化し、MKC-963 が結合できなくなった可能性が考えられる。そのために、アミノ酸変異体を用いたレポータージーンアッセイでは MKC-963 によるヒト PXR の活性化に S247 は重要であると考えられたが、ヒト PXR-LBD の X 線結晶構造を用いた分子力場計算から推定した MKC-963 とヒト PXR-LBD との結合様式からは、MKC-963 と S247 との相互作用が認められなかったと考えられた。

MKC-963 によるヒトおよびラット PXR 活性化の種差に 2 つの水素結合が関与している可能性が示唆されたことから、MKC-963 をヒト PXR と水素結合を形成しない構造に変換することにより、ヒト PXR の活性化やヒトでの CYP3A 誘導を回避できる可能性が考えられる。MKC-963 の構造類似体は多数存在するが、MKC-963 がヒト PXR と水素結合を形成すると示唆された窒素は、薬効に重要であったことから、それらの窒素を置換した構造類似体は合成されな

った。しかしながら、F281、F420 や W299 と疎水的な相互作用を形成すると考えられた部位を置換した誘導体は存在しており、それら誘導体によるヒト PXR 活性化をレポーター遺伝子アッセイで検討したところ、ヒト PXR の活性化は減弱していた (data not shown)。したがって、本章で検討したヒト PXR と化合物が相互作用するアミノ酸残基の推定から、化合物によるヒト PXR 活性化を回避するための構造情報が得られる可能性があるものと考えられた。

## 第五節 小活

- 1 . MKC-963 によるヒト PXR のアミノ酸変異体 ( S247A、Q285I、H407A ) の活性化について、レポータージーンアッセイを用いて検討したところ、いずれの変異体でも有意な活性化は認められなかったことから、S247、Q285 および H407 は MKC-963 によるヒト PXR の活性化に必須であると考えられた。
- 2 . ヒト PXR-LBD の X 線結晶構造を用いた分子力場計算により、MKC-963 とヒト PXR-LBD との結合様式を推定したところ、MKC-963 は、H407 および Q285 と水素結合を、F281、F420 および W299 と疎水的な相互作用を形成すると考えられた。

以上の結果から、ヒト PXR の H407 および Q285 と MKC-963 との 2 つの水素結合が、ヒト PXR の活性化に必須であると考えられた。ラットの PXR では、H407 はグルタミン、Q285 はイソロイシンであり、イソロイシンの側鎖は水素結合を形成しないことから、MKC-963 はラット PXR と 2 つの水素結合を維持できないものと考えられ、その結果、MKC-963 はラット PXR に対する活性化が弱かった可能性が示唆された。したがって、MKC-963 によるヒトおよびラットの PXR 活性化の種差は、H407 および Q285 のアミノ酸残基の相違が一因となっている可能性が示唆された。

## 第五章 QCM 法を利用したヒト PXR-LBD タンパクとリガンドとの結合に関する検討

### 第一節 序文

MKC-963 を用いた本研究においても再確認されたが、化合物によるヒト PXR の活性化をレポータージーンアッセイにて検討し、あらかじめヒト PXR を活性化する化合物を医薬品候補から除外しておくことが、ヒトで CYP3A を誘導しない医薬品の開発に重要であると考えられている [23, 24, 25, 26]。しかし、創薬の初期段階においては、ヒト PXR の活性化を検討すべき化合物の数は膨大で、多種多様であるため、細胞毒性のある化合物や細胞へ取り込まれない化合物も存在し、細胞を用いた測定系であるレポータージーンアッセイでは検討不可能な場合も想定される。

化合物によるヒト PXR の活性化を、リガンドとその結合部位であるヒト PXR-LBD タンパクとの結合として測定することができれば、細胞毒性のある化合物や細胞へ取り込まれない化合物であっても誘導能を測定できる可能性がある。実際に、Jones らはヒト PXR-LBD タンパクを大腸菌を用いて合成し、そのヒト PXR-LBD タンパクを用いてヒト PXR のリガンドである tritium で標識した SR12813 の結合を測定できると報告している [14]。しかしながら、大腸菌はヒト PXR-LBD タンパクが不溶化しやすく、容易な合成方法ではない [14]。一方、小麦胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク合成法は、大腸菌に比べ目的タンパクの不溶化が起こりにくく、目的タンパク以外の合成もわずかであり、精製が容易であることから、近年、タンパク合成法として盛んに利用されている [67]。さらに、水晶発振子マイクロバランス法 (QCM 法) は極微量の物質の結合を振動数変化として検出するため、測定物質を標識せずに測定することが可能である [27, 28]。そこで本章では、小麦胚芽抽出液無細胞合成系にて作成したヒト PXR-LBD タンパクを用いて、リガンドとの結合を QCM 法により検出する方法が、ヒト PXR のリガンドを除外するために新たな測定法となるか否かについて検討した。

### 第二節 方法

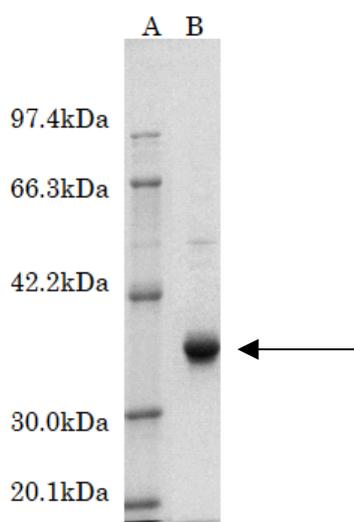
#### 1. 試薬

MKC-963 および rifampicin は第一章、第二章と同様のものを用いた。Hyperforin はコスモ・バイオ株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。その他の試薬は特級を用いた。

#### 2. ヒト PXR-LBD タンパクの発現および精製

タンパクの発現は、小麦胚芽抽出液無細胞発現系 (Zoegene, Tokyo, Japan) を用いて実

施した。ヒト PXR-LBD (130-434)は、Jones らの報告 [14] を参考に、pTarget-hPXR を template として His-tag を含む以下のプライマー (5'-CCT CTT CCA GGG CCC ACA TAT GAG TGA ACG GAC AGG GAC TCA GC-3' ; forward、および 5'-CTC GAG CTT GTC GTC GTC ATC GCT ACC TGT GAT GCC GAA CAA CTC-3' ; reverse) を用いて、PCR 法にて調製した。このヒト PXR-LBD (130-434) を鋳型として SP6 RNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA)にて合成した RNA を小麦胚芽抽出液に添加し、26 ℃、21 時間インキュベートすることでヒト PXR-LBD タンパクを合成した。タンパクの精製は以下のように行った。タンパク溶液にイミダゾールを 20 mM になるよう添加し、同濃度のイミダゾールを含むバッファーA( 20 mM Hepes、pH7.5、20 mM NaCl、0.1% CHAPS、5 mM  $\beta$ -mercaptethanol、10% Glycerol ) で平衡化した Ni-agarose カラムにアプライした。イミダゾールを含むバッファーA で洗浄後、50 mM ~ 250 mM のイミダゾールで直線的濃度勾配をかけてタンパクを溶出させた。ヒト PXR-LBD タンパクを含む画分をプールし、バッファーA で平衡化した Q-Sepharose FF カラムにアプライした。バッファーA で洗浄後、NaCl 濃度を 0.5 M とし、ステップワイズで溶出させてヒト PXR-LBD タンパクを得た。SDS-PAGE の後 CBB 染色を行った結果、ヒト PXR-LBD タンパクは高純度で精製、回収された (Fig. 11)。



**Fig. 11. Purification of hPXR-LBD from reaction mixture of weat germ extract.** SDS-PAGE of purified preparations resulted in a single band. Lane A, protein marker (97.4 kDa, phosphorylase b; 66.3 kDa, bovine serum albumine; 42.2 kDa, aldolase; 30 kDa, carbonic anhydrase; 20.1 kDa; trypsin inhibitor). Lane B, purified preparation. An arrow indicated purified hPXR-LBD protein.

### 3. QCM 法を用いたヒト PXR-LBD タンパクと化合物との結合実験

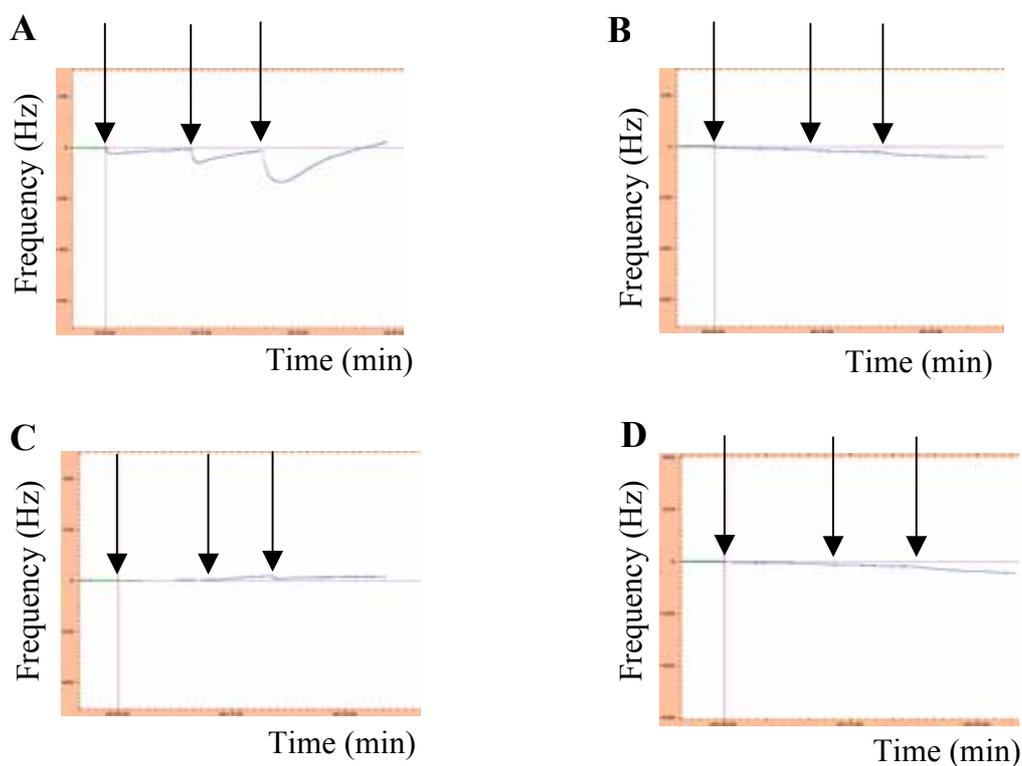
Poly-L-lysine (PLL) でコートした水晶発振子にヒト PXR-LBD (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を 20  $\mu\text{L}$  アプライし、湿潤箱中で 1 時間、室温にてインキュベートすることで、タンパクを固定化した。この発振子を AFFINIX Q (Initium, Tokyo, Japan) にセットし PBS 中で振動数を安定化させた後、結合実験に使用した。ブランクとしては PLL コートしたのみの水晶発振子を用いた。PCN、リファンピシン、MKC-963 および hyperforin を規定した濃度となるように添加し、振動数変化を測定した。溶媒のみの反応は DMSO のみを添加して、同様に振動数変化を測定した。

### 4. 統計解析

第一章と同様に実施した。

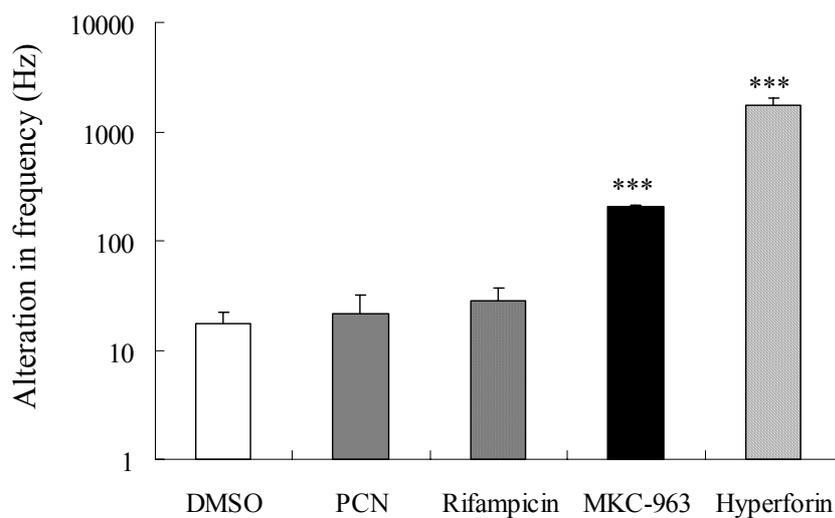
### 第三節 結果

水晶発振子にヒト PXR-LBD タンパクを固定化し、MKC-963 および溶媒である DMSO による振動数減少を QCM 法にて測定したところ、MKC-963 による振動数変化は認められたが、DMSO による振動数減少はほとんど認められなかった (Fig. 12A, 12B)。これに対し、水晶発振子にヒト PXR-LBD タンパクを固定化していない場合には、MKC-963、DMSO ともに振動数の減少はほとんど認められなかった (Fig. 12C, 12D)。



**Fig. 12. Effect of MKC-963 on the frequency of quartz crystal microbalance immobilized with or without hPXR-LBD protein.** (A) MKC-963 (3, 7 and 20  $\mu\text{M}$ ) was added to a cuvette in which hPXR-LBD protein was immobilized on a gold electrode surface of a ceramic sensor chip coated by poly-L-lysine. (B) DMSO was added to a cuvette in which hPXR-LBD protein was immobilized on a gold electrode surface of a ceramic sensor chip coated by poly-L-lysine. (C) MKC-963 (3, 7 and 20  $\mu\text{M}$ ) was added to a cuvette without hPXR-LBD protein. (D) DMSO was added to a cuvette without hPXR-LBD protein. DMSO was used as a vehicle control.

水晶発振子にヒト PXR-LBD タンパクを固定化し、MKC-963 の他、PCN、リファンピシン、hyperforin を 30  $\mu$ M 添加した時の振動数変化量を QCM 法にて測定し、DMSO での振動数変化量と比較したところ、MKC-963 と hyperforin では有意な変化が認められたが、PCN とリファンピシンでは有意な変化は認められなかった (Fig. 13)。



**Fig. 13. Effect of PCN, rifampicin, MKC-963 and hyperforin on the frequency of quartz crystal microbalance immobilized with hPXR-LBD protein.** Each compound (30  $\mu$ M) was added to a cuvette in which hPXR-LBD protein was immobilized on a gold electrode surface of a ceramic sensor chip coated by poly-L-lysine. DMSO was used as a vehicle control. Each value is the mean  $\pm$  SD of three experiments.

#### 第四節 考察

ヒト PXR のリガンドを除外するための新たな測定法として、QCM 法を用いたヒト PXR-LBD タンパクとリガンドとの結合実験について検討したところ、QCM 法は、ヒト PXR-LBD タンパクと MKC-963 および hyperforin との結合を検出できると考えられたが、リファンピシンの結合を検出することはできなかった。各化合物の振動数変化量を比較すると、hyperforin が最も大きく、次いで MKC-963 であり、リファンピシンは PCN よりも若干大きいものの DMSO での変化と有意な差は認められなかった (Fig. 13)。振動数変化量は結合している物質の量に比例することから [27, 28] 同濃度での結合量は hyperforin が最も大きく、次いで MKC-963 であり、リファンピシンと PCN の結合量はわずかであると考えられた。リファンピシンがヒト PXR のリガンドであり、PCN はヒト PXR のリガンドではないことから [14, 16, 17] 現在の測定法ではリファンピシンのように検出できないリガンドも存在した。しかしながら、QCM 法によるヒト PXR-LBD タンパクとリガンドとの結合実験は、細胞を用いない測定法であるため、細胞毒性や細胞に取り込まれないなどの化合物であっても測定できる可能性があり、さらにレポータージーンアッセイに比べれば、測定に要する時間もはるかに短い時間で済むことから、膨大な化合物からヒト PXR のリガンドを効率よく除外する方法としての利用価値はあるものと考えられる。したがって、現状では改善の余地はあるものの、QCM 法は将来多様な医薬品候補化合物の中からヒト PXR のリガンドを除外する際の簡便な測定法として利用できる可能性はあるものと考えられた。

リファンピシン添加で有意な振動数変化が認められなかった理由は不明だが、細胞系ではヒト PXR にリガンドが結合した後に SRC-1 などの転写促進因子の関与や、リン酸化酵素の働きにより誘導率が増幅されるという報告がある [57, 68]。今回検討した QCM 法ではヒト PXR-LBD タンパクと化合物のみの相互作用を測定しており、反応を増幅させる因子は含まれていない。そのためにリファンピシンによる振動数変化が認められず、他の化合物も高濃度の添加が必要であった可能性が考えられた。

QCM 法は物質の結合を振動数減少として検出する原理であることを考慮すると [27, 28] ヒト PXR-LBD タンパクとリファンピシンの結合を QCM 法で検出するためには、より多くのリファンピシンをヒト PXR タンパクに結合させる必要があり、より多くのリファンピシンをヒト PXR-LBD タンパクと結合させるには、ヒト PXR-LBD タンパクの固定化量を増加させればよいと考えられる。第三章での検討により、MKC-963 はリファンピシンよりもヒト PXR 活性化に対する  $EC_{50}$  値が小さいことから、ヒト PXR との親和性は強いものと考えられるが、本法の予備検討時には、ヒト PXR-LBD タンパクと MKC-963 との結合さえも検出できなかった。しかしながら、水晶発振子へのヒト PXR-LBD タンパクの固定化法を改良し、本法で実施している PLL でコートした水晶発振子にヒト PXR-LBD タンパクを固定化することにより、ヒト PXR-LBD タンパクと MKC-963 との結合が測定可能となった。これは、水晶発振子を PLL でコートすることによりタンパクの固定化量が数倍増加したためと考えられた

(data not shown)。したがって、固定化法をさらに検討し、ヒト PXR-LBD タンパクの固定化量を増やすことができれば、リファンピシンを検出できる方法に改良できる可能性はあるものと考えられた。

## 第五節 小活

1. 水晶発振子にヒト PXR - LBD タンパクを固定化した場合と固定化させなかった場合で、MKC-963 と溶媒である DMSO を添加し、QCM 法にて振動数を測定したところ、ヒト PXR-LBD タンパクと MKC-963 が存在した時にのみ、振動数の減少が認められた。
2. PCN、リファンピシン、MKC-963 および Hyperforin 添加による振動数の変化量を DMSO の変化量と比較したところ、MKC-963 および Hyperforin で有意な差が認められた。その変化量は多い順に Hyperforin > MKC-963 > リファンピシン PCN であった。

以上より、QCM 法は、ヒト PXR-LBD タンパクと MKC-963 および Hyperforin の結合は検出するが、リファンピシンについては反応性が低かったことから、さらなる改善が必要であると考えられた。しかし、本法は、将来、多様な医薬品候補化合物の中からヒト PXR のリガンドを除外する際の簡便な測定法の 1 つとして利用できる可能性はあるものと考えられた

## 総括

- 1 . ラットを用いた酵素誘導試験および健常人を対象とした臨床試験の結果、MKC-963 はラットの CYP3A を誘導しなかったが、ヒトの CYP3A を誘導したことから、MKC-963 による CYP3A 誘導にはラットとヒトで種差があることが示唆された。さらに健常人を対象とした臨床試験においては、MKC-963 自身の血漿中濃度も減少させたことから、MKC-963 は自己誘導剤である可能性が示唆された。
- 2 . ヒト肝初代培養系での MKC-963 による CYP3A 誘導試験およびヒト CYP 分子種発現系による MKC-963 の代謝酵素推定の結果、MKC-963 は CYP3A4 を誘導し、CYP3A4 の基質になることが明らかとなった。以上の結果から、MKC-963 は CYP3A4 の誘導剤であり、自身の代謝を誘導する自己誘導剤である可能性が強く示唆された。
- 3 . MKC-963 によるヒトおよびラット PXR の活性化をレポータージーンアッセイにより検討したところ、MKC-963 はヒト PXR を強力に活性化するが、ラット PXR の活性化は弱いことが明らかとなった。これらの結果は、MKC-963 がヒトの CYP3A を誘導するが、ラットの CYP3A を誘導しないという結果とよく一致し、MKC-963 による CYP3A 誘導のヒトとラットにおける種差は、MKC-963 による PXR の活性化の違いに原因がある可能性が強く示唆された。
- 4 . MKC-963 によるヒト PXR のアミノ酸変異体 (S247A、Q285I、H407A) の活性化について、レポータージーンアッセイを用いて検討した結果、およびヒト PXR-LBD の X 線結晶構造を用いた分子力場計算により推定した MKC-963 とヒト PXR-LBD との結合様式から、ヒト PXR の H407 および Q285 と MKC-963 との 2 つの水素結合が、ヒト PXR の活性化に必須であると考えられた。ラットの PXR では、H407 はグルタミン、Q285 はイソロイシンであり、イソロイシンの側鎖は水素結合を形成しないことから、MKC-963 はラット PXR と 2 つ水素結合を維持できないものと考えられ、その結果、MKC-963 はラット PXR に対する活性化作用が弱かった可能性が示唆された。したがって、MKC-963 によるヒトおよびラットの PXR 活性化の種差は、H407 および Q285 のアミノ酸残基の相違が一因となっている可能性が示唆された。
- 5 . QCM 法を用いてヒト PXR-LBD タンパクとリガンド (リファンピシン、MKC-963 および Hyperforin) との結合を測定した結果、MKC-963 と Hyperforin の結合は測定されたが、リファンピシンの結合は認められなかった。したがって、QCM 法はさらなる改善が必要であるものの、多様な医薬品候補化合物の中からヒト PXR のリガンドを除外する際の簡便な測定法の 1 つとして利用できる可能性はあるものと考えられた。

## 今後の展望と提言

最後に本研究の成果を今後の医薬品開発に利用した将来像について若干の私見を以下に述べたい。

現在の医薬品開発においては膨大な数の化合物から医薬品候補を選択するスクリーニングが実施されているが、その中には細胞毒性や細胞に取り込まれない性質の化合物も存在すると想定される。したがって、最初のスクリーニングとしては、細胞を使わず、簡便なヒト PXR-LBD タンパクを用いたバインディングアッセイが適当と考えられる。次にヒト PXR を用いたレポーター遺伝子アッセイを実施することで、ヒト PXR のリガンドを医薬品候補から除外することができる。さらにヒト *in vivo* の血漿中濃度を考慮してヒト肝細胞を用いた誘導試験を実施した後、臨床試験を行えば CYP3A の誘導で開発が中断するというリスクを低減させることができると考えている。さらに、医薬品候補からは除外されたヒト PXR のリガンドについてはドッキングスタディを実施し、結合様式を推定することで、PXR を活性化させない構造に関する情報が得られる可能性がある。その情報から合成した誘導体の PXR 活性化を検証する、といった作業を繰り返すことにより構造と PXR 活性化に関する情報が蓄積される。その蓄積された結果を元に、ヒト PXR を活性化させないと予測される化合物を合成することができれば、医薬品候補から除外される化合物が減り、創薬の効率化にも貢献できると思われる。

## 参考文献

- 1 Li AP, Kaminsky DL and Rasmussen U (1995) Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. *Toxicology* **104**:1-8.
- 2 中川義人 (1994) 医薬品相互作用、医薬ジャーナル
- 3 杉山正康、神谷大雄 (1997) 薬の相互作用としくみ、医歯薬出版
- 4 Prueksaritanont T, Ma B and Yu N (2003) The human hepatic metabolism of simvastatin hydroxy acid is mediated primarily by CYP3A, and not CYP2D6. *Br J Clin Pharmacol* **56**:120-124.
- 5 Jerling M, Huan BL, Leung K, Chu N, Abdallah H and Hussein Z (2005) Studies to investigate the pharmacokinetic interactions between ranolazine and ketoconazole, diltiazem, or simvastatin during combined administration in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* **45**:422-33.
- 6 Anderson GD (1998) A mechanistic approach to antiepileptic drug interactions. *Ann Pharmacother* **32**:554-63.
- 7 Drocourt L, Pascussi JM, Assenat E, Fabre JM, Maurel P and Vilarem MJ (2001) Calcium Channel modulators of the dihydropyridine family are human pregnane X receptor activators and inducers of CYP3A, CYP2B, and CYP2C in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **29**:1325-1331.
- 8 Luo G, Cunningham M, Kim S, Burn T, Lin J, Sinz M, Hamilton G, Rizzo C, Jolley S, Gilbert D, Downey A, Mudra D, Graham R, Carroll K, Xie J, Madan A, Parkinson A, Christ D, Selling B, LeCluyse E and Gan LS (2002) CYP3A4 induction by drugs: Correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **30**: 795-804.
- 9 Ridditid W, Wongnawa M, Mahatthanatrakul W, Punyo J and Sunbhanich M (2002) Rifampin markedly decreases plasma concentrations of praziquantel in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* **72**:505-513.
- 10 Sahi J, Black CB, Hamilton GA, Zheng X, Jolley S, Rose KA, Gilbert D, LeCluyse EL and Sinz MW (2003) Comparative effects of thiazolidinediones on in vitro P450 enzyme induction and inhibition. *Drug Metab Dispos* **31**:439-446.
- 11 Crespi CL and Miller VP (1999) The use of heterologously expressed drug metabolizing enzymes state of the art and prospects for the future. *Pharmacol Ther* **84**:121-131.
- 12 Suzuki A, Iida I, Hirota M, Akimoto M, Higuchi S, Suwa T, Tani M, Ishizaki T, Chiba K (2003) CYP isoforms involved in the metabolism of clarithromycin in vitro: comparison between the identification from disappearance rate and that from

- formation rate of metabolites. *Drug Metab Pharmacokinet* **18**:104-113.
- 13 Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT and Kliewer SA (1998) The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest* **102**:1016-1023.
  - 14 Jones SA, Moore LB, Shenk JL, Wisely GB, Hamilton GA, McKee DD, Tomkinson NC, LeCluyse EL, Lambert MH, Willson TM, Kliewer SA and Moore JT (2000) The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol Endocrinol* **14**:27-39.
  - 15 LeCluyse EL (2001) Pregnane X receptor: molecular basis for species differences in CYP3A induction by xenobiotics. *Chem-Biol Interact* **134**:283-289.
  - 16 Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, Åsman M, Jendeberg L, Sydow-Bäckman M, Ohlsson R, Postlind H, Blomquist P and Berkenstam A (1998) Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:12208-12213.
  - 17 Blumberg B, Sabbagh W Jr., Juguilon H, Bolado J Jr., van Meter CM, Ong ES and Evans RM (1998) SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev* **12**:3195-3205.
  - 18 Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterström RH, Perlmann T and M Lehmann JM (1998) An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway *Cell* **92**:73-82.
  - 19 Zhang H, LeCluyse E, Lin L, Hu M, Matoney L, Zhu W and Yan B (1999) Rat pregnane X receptor: molecular cloning, tissue distribution, and xenobiotic regulation. *Arch Biochem Biophys* **368**:14-22.
  - 20 Chrencik JE, Orans J, Moore LB, Xue Y, Peng L, Collins JL, Wisely GB, Lambert MH, Kliewer SA and Redinbo MR (2005) Structural disorder in the complex of human pregnane X receptor and the macrolide antibiotic rifampicin. *Mol Endocrinol* **19**:1125-1134.
  - 21 Östberg T, Bertilsson G, Jendeberg L, Berkenstam A and Uppenberg J (2002) Identification of residues in the PXR ligand binding domain critical for species specific and constitutive activation. *Eur J Biochem* **269**:4896-4904.
  - 22 Tirona RG, Leake BF, Podust LM and Kim RB (2004) Identification of amino acids in rat pregnane X receptor that determine species-specific activation. *Mol Pharmacol* **65**:36-44.
  - 23 Ogg MS, Williams JM, Tarbit M, Goldfarb PS, Gray TJB and Gibson GG (1999) A reporter gene assay to assess the molecular mechanisms of xenobiotic-dependent induction

- of the human CYP3A4 gene in vitro. *Xenobiotica* **29**:269-279.
- 24 El-Sankary W, Plant NJ, Gibson GG and Moore DJ (2000) Regulation of the CYP3A4 gene by hydrocortisone and xenobiotics: role of the glucocorticoid and pregnane X receptors. *Drug Metab Dispos* **28**:493-496.
  - 25 Moore JT and Kliewer SA (2001) Use of the nuclear receptor PXR to predict drug interactions. *Toxicology* **153**:1-10.
  - 26 Rodrigues AD and Lin JH (2001) Screening of drug candidates for their drug drug interaction potential. *Curr Opin Chem Biol* **5**:396-401.
  - 27 Okahata Y and Ebato H (1989) Application of a quartz-crystal microbalance for detection of phase transitions in liquid crystals and lipid multibilayers. *Anal Chem* **61**:2185-2188.
  - 28 Okahata, Kimura K, and Ariga K (1989) Detection of the phase transition of langmuir-blodgett films on a quartz-crystal microbalance in an aqueous phase. *J Am Chem Soc* **111**:9190-9194.
  - 29 Kocarek TA, Schuetz EG, Strom SC, Fisher RA and Guzelian PS (1995) Comparative analysis of cytochrome P4503A induction in primary cultures of rat, rabbit, and human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **23**:415-421.
  - 30 Lake BG, Renwick AB, Cunningham ME, Price RJ, Surry D and Evans DC (1998) Comparison of the effects of some CYP3A and other enzyme inducers on replicative DNA synthesis and cytochrome P450 isoforms in rat liver. *Toxicology* **131**:9-20.
  - 31 Nebbia C, Ceppa L, Dacasto M, Carletti M and Nachtmann C (1999) Oxidative metabolism of monensin in rat liver microsomes and interactions with tiamulin and other chemotherapeutic agents: Evidence for the involvement of cytochrome P-450 3A subfamily. *Drug Metab Dispos* **27**:1039-1044.
  - 32 Tran JQ, Kovacs SJ, McIntosh TS, Davis HM and Martin DE (1999) Morning spot and 24-hour urinary 6 $\beta$ -hydroxycortisol to cortisol ratios: Intraindividual variability and correlation under basal conditions and conditions of CYP 3A4 induction. *J Clin Pharmacol* **39**:487-494.
  - 33 Kovacs SJ, Martin DE, Everitt DE, Patterson SD and Jorkasky DK (1998) Urinary excretion of 6 $\beta$ -hydroxycortisol as an in vivo marker for CYP3A induction: Applications and recommendations. *Clin Pharmacol Ther* **63**:617-622.
  - 34 Galteau MM and Shamsa F (2003) Urinary 6 $\beta$ -hydroxycortisol: a validated test for evaluating drug induction or drug inhibition mediated through CYP3A in humans and in animals. *Eur J Clin Pharmacol* **59**:713-733.
  - 35 Ohnhaus EE, Breckenridge AM and Park BK (1989) Urinary excretion of 6 $\beta$ -hydroxycortisol and the time course measurement of enzyme induction in man.

- Eur J Clin Pharmacol* **36**:39-46.
- 36 Niemi M, Backman JT, Fromm MF, Neuvonen PJ and Kivisto KT (2003) Pharmacokinetic interactions with rifampicin. *Clin Pharmacokinet* **42**:819-850.
  - 37 Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T and Waxman DJ (1986) Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem* **261**:5051-5060.
  - 38 Shimada T Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* **270**: 414-423.
  - 39 Watkins PB, Wrighton SA, Schuetz EG, Molowa DT and Guzelian PS (1987) Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man. *J Clin Invest* **80**: 1029-1036.
  - 40 Kolars JC, Schmiedlin-Ren P, Schuetz JD, Fang C and Watkins PB (1992) Identification of rifampin-inducible P450IIIA4 (CYP3A4) in human small bowel enterocytes. *J Clin Investig* **90**:1871-1878.
  - 41 Holtbecker N, Fromm MF, Kroemer HK, Ohnhaus EE and Heidemann H (1996) The nifedipine-rifampin interaction: Evidence for induction of gut wall metabolism. *Drug Metab Dispos* **24**:1121-1123.
  - 42 Ndanusa BU, Mustapha A and Abdu-Aguye I (1997) The effect of single dose of rifampicin on the pharmacokinetics of oral nifedipine. *J Pharm Biomed Anal* **15**:1571-1575.
  - 43 Roymans D, Van Looveren C, Leone A, Parker JB, McMillian M, Johnson MD, Koganti A, Gilissen R, Silber P, Mannens G and Meuldermans W (2004) Determination of cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 3A4 induction in cryopreserved human hepatocytes. *Biochem Pharmacol* **67**:427-437.
  - 44 Rodrigues AD (1999) Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping. *Biochem Pharmacol* **57**:465-480.
  - 45 Donato MT, Castell JV and Gómez-Lechón MJ (1995) Effect of model inducers on cytochrome P450 activities of human hepatocytes in primary culture. *Drug Metab Dispos* **23**:553-558.
  - 46 Obach RS (1999) Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: an examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab Dispos* **27**:1350-1359.
  - 47 Wrighton SA, Brian WR, Sari MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Raucy JL, Molowa DT and

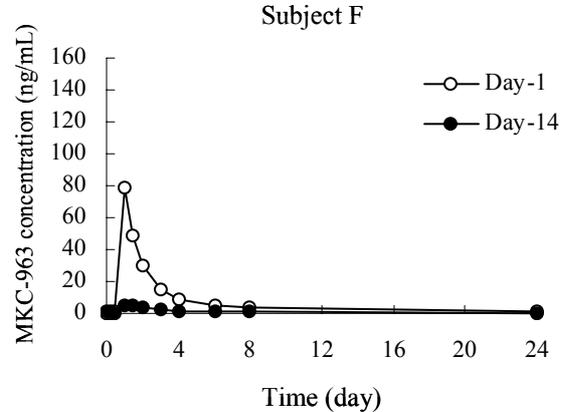
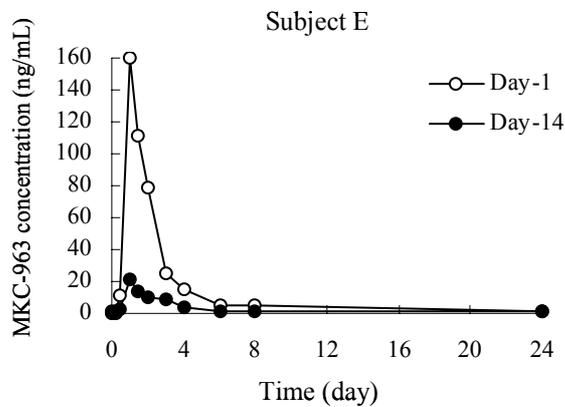
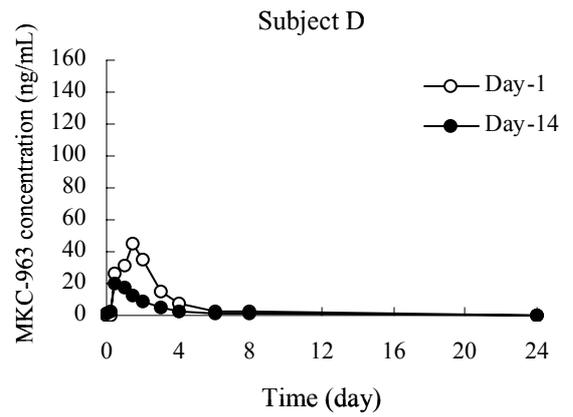
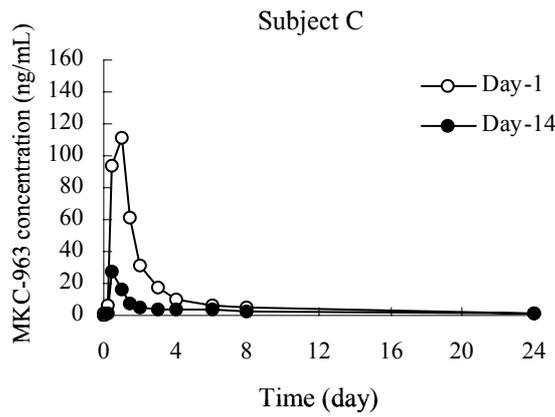
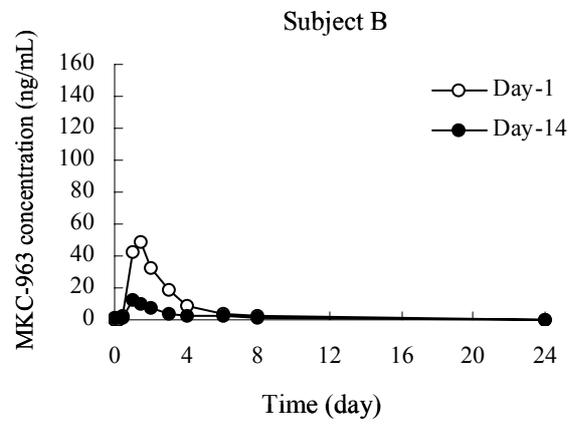
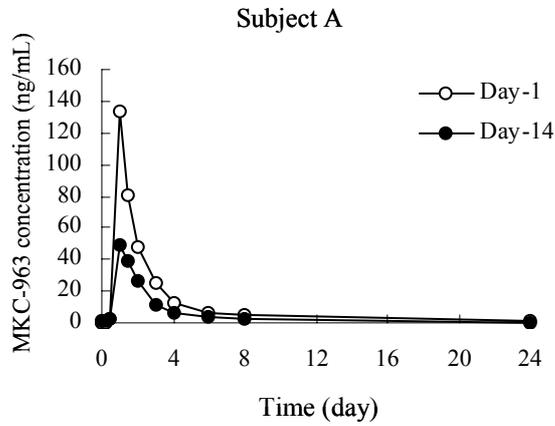
- Vandenbranden M (1990) Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450IIIA5 (HLp3). *Mol Pharmacol* **38**:207-213.
- 48 Zhuo X, Zheng N, Felix CA and Blair LA (2004) Kinetics and regulation of cytochrome P450-mediated etoposide metabolism. *Drug Metab Dispos* **32**:993-1000.
- 49 Smith DA (2000) Induction and drug development. *Eur J Pharm Sci* **11**:185-189.
- 50 Mitsuhashi Y, Sugiyama Y, Ozawa S, Nitani T, Sasahara K, Nakamura K, Tanaka M, Nishimura T, Inaba M and Kobayashi T (1990) Prediction of ACNU plasma concentration-time profiles in humans by animal scale-up. *Cancer Chemother Pharmacol* **27**:20-26.
- 51 Izumi T, Enomoto S, Hosiyama K, Sasahara K, Shibukawa A, Nakagawa T and Sugiyama Y (1996) Prediction of the human pharmacokinetics of troglitazone, a new and extensively metabolized antidiabetic agent, after oral administration, with an animal scale-up approach. *J Pharmacol Exp Ther* **277**:1630-1641.
- 52 Iwatsubo T, Hirota N, Ooie T, Suzuki H, Shimada N, Chiba K, Ishizaki T, Green CE, Tyson CA and Sugiyama Y (1997) Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. *Pharmacol Ther* **73**:147-71.
- 53 Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Ueda K, Suzuki H and Sugiyama Y (1998) Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol Rev* **50**:387-412.
- 54 Kobayashi K, Yamagami S, Higuchi T, Hosokawa M and Chiba K (2004) Key structural features of ligands for activation of human pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos* **32**:468-472.
- 55 Brobst DE, Ding X, Creech KL, Goodwin B, Kelley B and Staudinger JL (2004) Guggulsterone activates multiple nuclear receptors and induces CYP3A gene expression through the pregnane X receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **310**:528-535.
- 56 Watkins RE, Wisely GB, Moore LB, Collins JL, Lambert MH, Williams SP, Willson TM, Kliewer SA and Redinbo MR (2001) The human nuclear xenobiotic receptor PXR: structural determinants of directed promiscuity. *Science* **292**:2329-2333.
- 57 Watkins RE, Davis-Searles PR, Lambert MH and Redinbo MR (2003) Coactivator binding promotes the specific interaction between ligand and the pregnane X receptor. *J Mol Biol* **331**:815-828.
- 58 Watkins RE, Maglich JM, Moore LB, Wisely GB, Noble SM, Davis-Searles PR, Lambert MH, Kliewer SA and Redinbo MR (2003) 2.1 Å crystal structure of human PXR in complex with the St. John's wort compound hyperforin. *Biochemistry* **42**:1430-1438.
- 59 Xiao L, Cui X, Madison V, White RE and Cheng KC (2002) Insights from a three-dimensional model into ligand binding to constitutive active receptor. *Drug*

*Metab Dispos* **30**:951-956.

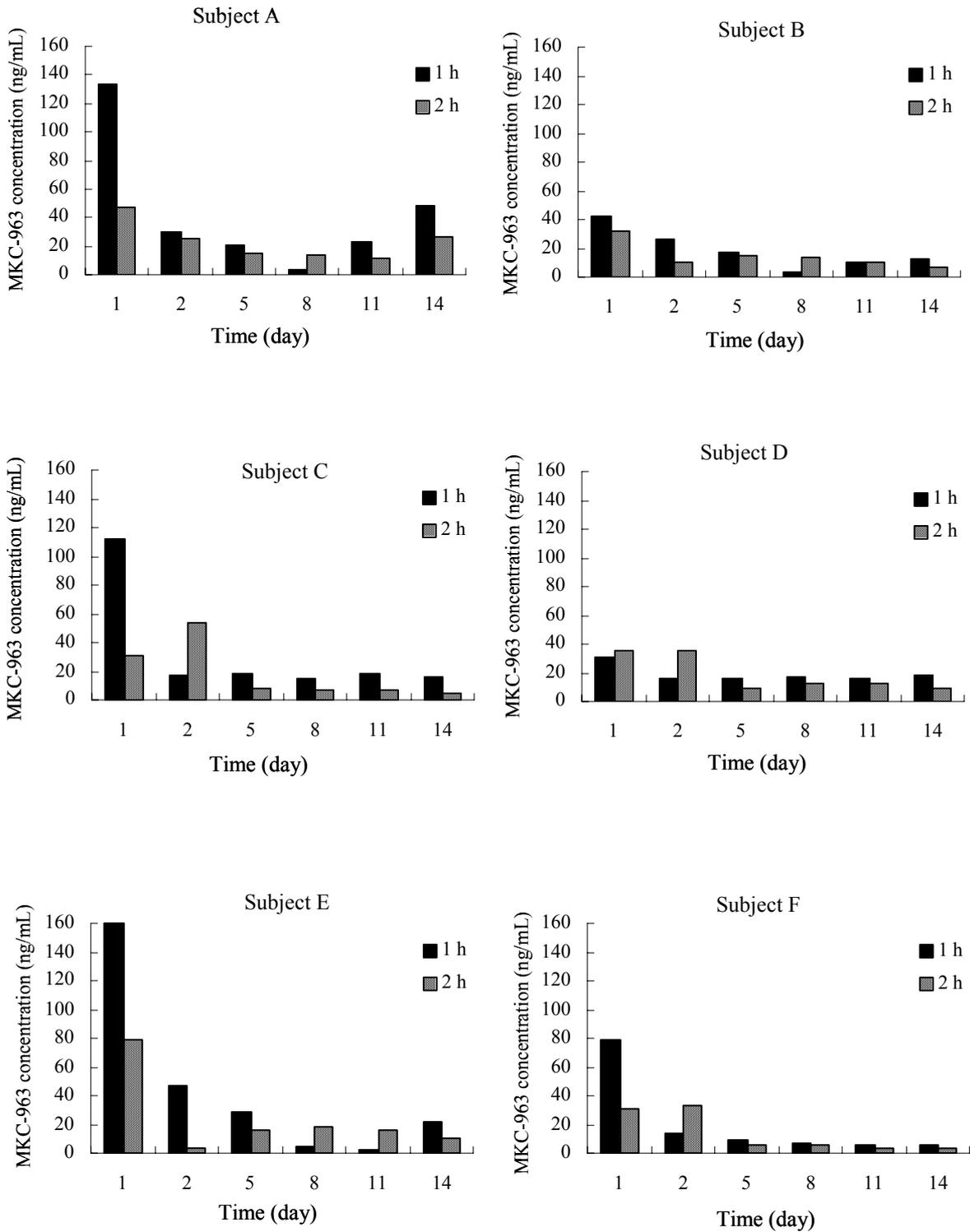
- 60 Torimoto N, Ishii I, Hata M, Nakamura H, Imada H, Ariyoshi N, Ohmori S, Igarashi T and Kitada M (2003) Direct interaction between substrates and endogenous steroids in the active site may change the activity of cytochrome P450 3A4. *Biochemistry* **42**:15068-15077.
- 61 Kawada M, Nagamori S, Aizaki H, Fukaya K, Niiya M, Matsuura T, Sujino H, Hasumura S, Yashida H, Muzutani S and Ikenaga H (1998) Massive culture of human liver cancer cells in a newly developed radial flow bioreactor system: ultrafine structure of functionally enhanced hepatocarcinoma cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol* **34**:109-115.
- 62 Jorgensen WL, Chandrasekhar J and Madura JD (1983) Composition of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* **79**:926-935.
- 63 Pearlman DA, Case DA, Caldwell JW, Ross WS, Cheatham TE III, Ferguson DM, Seibel GL, Singh UC, Weiner PK and Kollman PA (1995) AMBER 4.1, University of California, San Francisco.
- 64 Case DA, Pearlman DA, Caldwell JW, Cheatham TE III, Wang J, Ross WS, Simmerling CL, Darden TA, Merz KM, Stanton RV, Cheng AL, Vincent JJ, Crowley M, Tsui V, Gohlke H, Radmer RJ, Duan Y, Pitner J, Massova I, Seibel GL, Singh UC, Weiner PK and Kollman PA (2002) AMBER 7, University of California:San Francisco.
- 65 Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Zakrzewski VG, Montgomery JA Jr., Stratmann RE, Burant JC, Dapprich S, Millam JM, Daniels AD, Kudin KN, Strain MC, Farkas O, Tomasi J, Barone V, Cossi M, Cammi R, Mennucci B, Pomelli C, Adamo C, Clifford S, Ochterski J, Petersson GA, Ayala Y, Cui Q, Morokuma K, Salvador P, Dannenberg JJ, Malick DK, Rabuck AD, Raghavachari K, Foresman JB, Cioslowski J, Ortiz JV, Baboul AG, Stefanov BB, Liu G, Liashenko A, Piskorz P, Komaromi I, Gomperts R, Martin RL, Fox DJ, Keith T, Al-Laham MA, Peng CY, Nanayakkara A, Challacombe M, Gill PMW, Johnson B, Chen W, Wong MW, Andres JL, Gonzalez C, Head-Gordon M, Replogle ES and Pople JA (2001) Gaussian 98, Revision A.11.1, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA.
- 66 Moore LB, Maglich JM, McKee DD, Wisely B, Willson TM, Kliewer SA, Lambert MH and Moore JT (2002) Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR) and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors. *Mol Endocrinol* **16**:977-986.
- 67 Madin K, Sawasaki T, Kamura N, Takai K, Ogasawara T, Yazaki K, Takei T, Miura K and Endo Y (2004) Formation of circular polyribosomes in wheat germ cell-free protein synthesis system. *FEBS Lett* **562**:155-159.

- 68 Ding X and Staudinger JL (2005) Induction of drug metabolism by Forskolin: The role of the pregnane X receptor and the protein kinase A signal transduction pathway. *J Pharmacol Exp Ther* **312**:849-856.

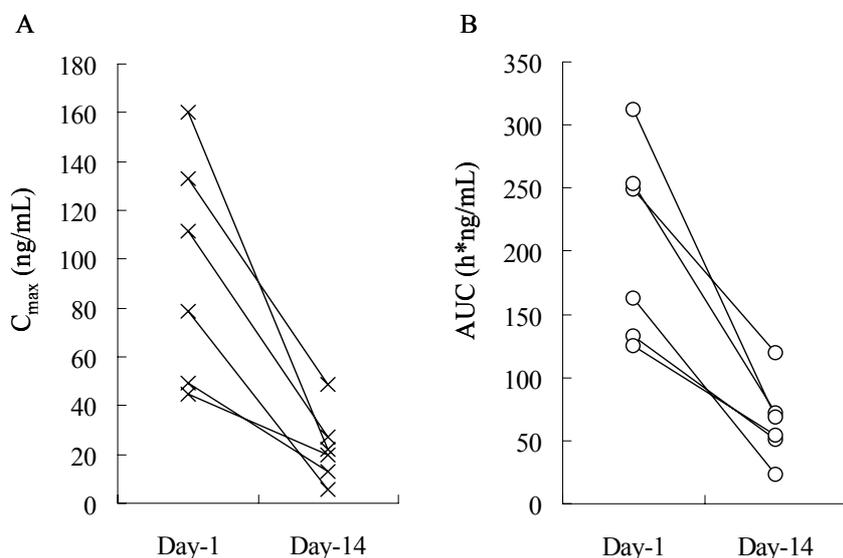
Appendix 1. Individual plasma concentration-time profiles of MKC-963 on day 1 (open circles) and day 14 (closed circles) after oral administration of 120 mg to six healthy subjects



Appendix 2. Individual plasma concentrations of MKC-963 at 1 hour and 2 hours after oral administration of the compound (120 mg) to 6 healthy subjects on days 1, 2, 5, 8, 11 and 14



Appendix 3. Changes in the individual values of  $C_{max}$  (A) and AUC (B) for MKC-963 in six healthy subjects after repeated administration of the compound for 14 days



Appendix 4. Individual value of urinary excretion ratios of  $6\beta$ -hydroxy cortisol and free cortisol in 24-hour urine on the day before the start of administration and on days 1, 2, 5, 8, 11 and 14

	Subject A	Subject B	Subject C	Subject D	Subject E	Subject F
pre	3.0	2.5	2.3	3.4	2.2	1.9
Day 1	3.2	2.6	2.8	3.2	2.2	1.8
Day 2	4.0	3.0	2.9	3.7	3.1	2.4
Day 5	7.8	3.8	5.1	5.6	5.0	4.4
Day 8	8.9	3.9	5.5	8.0	4.6	4.9
Day 11	8.4	9.1	5.4	6.3	4.7	5.7
Day 14	6.8	8.1	4.8	7.8	6.8	7.2

## 主論文目録

本学位論文内容は下記の発表論文による。

1. Shimizu. T, Akimoto. K, Yoshimura. T, Niwa. T, Kobayashi. K, Tsunoo. M and Chiba. K: Autoinduction of MKC-963 metabolism in healthy volunteers and its retrospective evaluation using primary human hepatocytes and cDNA-expressed enzymes. *Drug Metab Dispos (in press)*
2. Shimizu. T, Kobayashi. K, Suzuki. E and Chiba. K: Difference in the activation of pregnane X receptor by MKC-963 in rats and humans in relation to the induction of CYP3A. *(submitted)*
3. Shimizu. T, Kobayashi. K, Yamagami. S, Mikamoto. M, Hata. M and Chiba. K: Estimation of amino acids in human pregnane X receptor that interact with MKC-963 and determine species-specific activation. *(submitted)*

## 謝辞

本研究を通じて御指導、御鞭撻を賜りますとともに論文の御校閲を戴きました、千葉大学大学院薬学研究院遺伝子薬物学講座（薬物学研究室）千葉寛 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、御指導、御鞭撻を賜りました、千葉科学大学薬学部薬学科 製剤 / 薬物動態学研究室 細川正清 教授、千葉大学大学院薬学研究院遺伝子薬物学講座（薬物学研究室）小林カオル 助教授、降幡知巳 助手に厚く御礼申し上げます。

本研究にご協力戴きました千葉大学大学院薬学研究院ゲノム機能学講座（薬品物理化学研究室）畑晶之 助手に厚く御礼申し上げます。

本研究にご協力戴きました、三菱ウェルファーマ株式会社 創薬推進部 森尋昭 氏、薬物動態研究所 後藤信治 氏、丹羽卓朗 氏、木野一郎 氏、鳥本奈緒 氏、矢野愛子 氏をはじめ、薬物動態研究所の皆様にも厚く御礼申し上げます。

本研究を通じて、終始適切な御助言、御協力を戴きました、千葉大学大学院薬学研究院遺伝子薬物学講座（薬物学研究室）の皆様にも心より感謝致します。

最後に、健康面、精神面で支えてくれました妻、敦子、長女、美晴にも心より感謝致します。

## 主査、副査名

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査	千葉大学教授（医学研究院）	薬学博士	北田光一
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	上野光一
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	堀江利治
副査	千葉大学教授（薬学研究院）	薬学博士	荒野泰