



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アルデヒドオキシダーゼを介した薬物間相互作用および個体間差に関する研究
Author(s)	上田, 一奈太
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第16302号
Issue Date	2025-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16302
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/97591
Type	doctoral thesis
File Information	Hinata_Ueda.pdf



博士学位論文

アルデヒドオキシダーゼを介した薬物間相互作用および個体間差に関する研究

Evaluation of the pharmacokinetic contributions of aldehyde oxidase
and inter-individual differences due to single nucleotide polymorphisms

上田 一奈太

Ueda Hinata

北海道大学大学院生命科学院
臨床薬学専攻
臨床薬剤学研究室

令和7年3月

目次

略語／略号表	- 3 -
序文	- 4 -
第 1 章 副作用自発報告データベースを用いた AOX 関連有害事象の調査	- 7 -
1.1 緒言	- 7 -
1.2 研究手法	- 9 -
1.2.1 調査対象データベースおよび対象調査期間	- 9 -
1.2.2 解析手法および研究デザイン	- 9 -
1.2.3 副作用シグナル検出	- 11 -
1.3 結果	- 13 -
1.3.1 血液障害に関連する副作用報告の不均衡解析	- 13 -
1.3.2 肝障害に関連する副作用報告の不均衡解析	- 13 -
1.4 考察	- 18 -
1.5 小括	- 20 -
第 2 章 6-MP 代謝における各種 AOX 阻害薬剤による薬物動態変動	- 21 -
2.1 緒言	- 21 -
2.2 実験手法	- 22 -
2.2.1 試薬	- 22 -
2.2.2 HLC における 6-MP 代謝評価	- 22 -
2.2.3 recombinant XO における 6-MP 代謝評価	- 23 -
2.2.4 ラットにおける 6-MP 血中動態評価	- 23 -
2.2.5 Rat liver cytosol (RLC) における 6-MP 代謝評価	- 24 -
2.2.6 Organic anion transporter (OAT) を介した 6-CF 輸送実験	- 24 -
2.2.7 数値解析	- 24 -
2.3 結果	- 25 -
2.3.1 各種 AOX 阻害薬剤の HLC における 6-MP 代謝阻害効果	- 25 -
2.3.2 各種 AOX 阻害薬剤の recombinant XO における 6-MP 代謝阻害効果	- 27 -
2.3.3 Hydralazine 投与に伴うラット血中 6-MP 動態の変化	- 29 -
2.4 考察	- 32 -
2.5 小括	- 36 -

第3章 SNPs による AOX1 活性の差異ならびにその機序の解明	- 37 -
3.1 緒言	- 37 -
3.2 実験材料および方法	- 38 -
3.2.1 試薬	- 38 -
3.2.2 nsSNP の探索.....	- 38 -
3.2.3 nsSNP の変異有害性の予測.....	- 38 -
3.2.4 変異体 AOX1 プラスミドの作製.....	- 38 -
3.2.5 大腸菌の培養とプラスミド抽出.....	- 40 -
3.2.6 使用細胞および遺伝子導入	- 40 -
3.2.7 SDS, Native-PAGE/WB	- 40 -
3.2.8 Phthalazine 酸化アッセイ	- 41 -
3.2.9 UPLC-MS/MS による phthalazone の定量.....	- 41 -
3.2.10 数値解析	- 41 -
3.2.11 AOX1 タンパク質の立体構造表示および multiple alignment.....	- 42 -
3.3 実験結果	- 43 -
3.3.1 各 AOX1-SNPs におけるアレル頻度および各変異体の影響予測	- 43 -
3.3.2 単量体および二量体 AOX1 タンパク質の発現量.....	- 44 -
3.3.3 WT AOX1 の phthalazine 代謝評価	- 46 -
3.3.4 WT および Mut AOX1 の phthalazine 酸化能の差異.....	- 47 -
3.4 考察	- 48 -
3.5 小括	- 51 -
総括	- 52 -
参考文献.....	- 53 -
謝辞	- 62 -

略語／略号表

AOX	Aldehyde oxidase
AZA	Azathioprine
CYP	Cytochrome P450
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FAD	Flavin adenine dinucleotide
FAERS	Food and drug administration Adverse Event Reporting System
FBS	Fetal bovine serum
HBSS	Hanks' balanced salt solution buffer
HLC	Human liver cytosol
IVIVE	In vitro-in vivo extrapolation
JADER	Japanese Adverse Drug Event Report database
MAF	Minor allele frequency
MedDRA	Medical Dictionary for Regulatory Activities
Moco	Molybdenum cofactor
MRP	Multidrug resistance-associated protein
nsSNPs	Nonsynonymous single nucleotide polymorphisms
NUDT15	Nudix hydrolase 15
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion transporting polypeptide
PRR	Proportional reporting ratio
PS	Primary suspected drug
RLC	Rat liver cytosol
ROR	Reporting odds ratio
SS	Secondary suspected drug
WT	Wild type
WB	Western blotting
XDH	Xanthine dehydrogenase
XO	Xanthine oxidase
6-CF	6-Carboxyfluorescein
6-MP	6-Mercaptopurine
6-MMP	6-Methyl mercaptopurine
6-TGNs	6-Thioguanine nucleotides
6-TUA	6-Thiouric acid
6-TX	6-Thioxanthine
95% CI	95% confidence interval

序文

近年の創薬分野では、従来より医薬品の中心に位置する低分子医薬品に加え、アンチセンスや siRNA、アプタマーといった核酸医薬や PROTAC 等を含む中分子医薬品、さらに既存の抗体医薬に低分子化合物を結合させた抗体薬物複合体などの高分子医薬品など、モダリティの多様化が進んでいる。新規モダリティの活用により、既存の医薬品ではアプローチが困難であった創薬ターゲットを標的とした治療薬が増加している。しかしながら、その製造コストや安全性・品質性の不確実性から、依然として既存のモダリティである低分子医薬品の承認品目数は多く、国内外ともに新規承認医薬品全体の常時 60%前後を占めている。

低分子医薬品の薬効および毒性は、その化合物の薬理作用および薬物動態に依存する。薬物動態を左右する要因の一つに代謝クリアランスがあり、薬物代謝の第 I 相反応である酸化、還元を担う主要な酵素として知られる cytochrome P450 (CYP) は約 80%の医薬品の代謝に関与することが知られている。これまでの経験則や *in vivo*, *in vitro* レベルの基礎的な検証の蓄積、近年の *in silico* による予測精度の向上に伴い、現在上市されている医薬品について、ヒト CYP を介した薬物間相互作用の多くが解明されている。またこれらの代謝酵素の活性は、薬物治療における治療効果や副作用の発現に直接関連することから、近年の医薬品開発においては、薬物動態における個体間差を減らすため、CYP による代謝を受けづらい医薬品の上市が増加している。しかしながら CYP 以外の代謝酵素 (non-CYP) の酸化、還元機能に関するエビデンスは少ないことから、臨床研究に non-CYP による予期せぬ代謝を原因とした新規医薬品のドロップアウトが増加している¹⁾。以上より、包括的な薬物動態予測に向け、non-CYP による代謝クリアランスや薬物間相互作用の解明が急務であると考えられている。

Non-CYP の一種である aldehyde oxidase (AOX) は、CYP 同様に薬物の酸化還元反応を担う代謝酵素である一方で、CYP とは対照的な特徴を有する (AOX は細胞質に存在し、水由来の酸素原子を用いて酸化反応を行う。また基本的に電子密度の低い炭素を標的とし、NADPH 非依存的に酸化を行う。) ことから、基質代謝において相補的に機能している²⁾。またアルデヒドのみならず、脂環式化合物内のイミンからラクタムへの生成や含窒素複素環の酸化など、その基質認識性は広範であり、先述の通り AOX により代謝を受ける新規医薬品は数多く報告されている。新規 epidermal growth factor receptor (EGFR) 阻害剤として開発された BIBX1382 は、第 I 相臨床試験にて *in vitro* および *in vivo* で予期されなかった血中薬物濃度の低下により開発中止となり、後に AOX による代謝が薬効低下の原因であることが、human liver cytosol (HLC) および cynomolgus monkey における薬物動態試験で明らかとなった³⁻⁵⁾。またパーキンソン病治療薬としてアステラス製薬より開発されたアデノシン A1/A2 受容体二重阻害剤 FK3453 も、動物実験では良好な治療効果が得られた一方で、ヒトにおける AOX 代謝に伴う治療効果の低

下により開発が中止された^{6,7)}。間葉系上皮転換因子 c-MET 阻害剤として開発された SGX523 は, AOX により低溶解性の代謝物 M11 へと変換され, 閉塞性腎症の原因となることが知られている⁸⁾。その他にも, 新規 p38 MAPK 阻害剤やグルタミン酸受容体アロステリックモジュレーターである Lu AF09535 等も, 同様の理由で開発が中止されている。したがって, 新規医薬品の創出において AOX は薬物動態を決定する重要な因子であることが示唆されている^{9,10)}。

現在上市されている医薬品においても, AOX の基質となる化合物は数多く存在する。抗インフルエンザ薬として承認され COVID-19 治療にも用いられる favipiravir は, AOX を不可逆的に阻害することが知られており, favipiravir 自体も主に AOX により酸化され不活性代謝物 M1 に変換される¹¹⁾。第 I/II 相臨床試験においても AOX 活性が低い成人ボランティアでは favipiravir の濃度が高く, M1 濃度の低下が認められており, これらの化合物比率の変化が favipiravir の副作用である尿酸値上昇と関連する可能性が報告されている¹²⁾。代謝拮抗薬である methotrexate は, 大部分が未変化体で腎臓より排泄される一方で, 一部は AOX により 7 位が水酸化される。この 7-OH methotrexate 自体の細胞毒性は低い一方で, この代謝に伴う溶解度減少による腎尿細管析出が, methotrexate 誘発性腎障害の原因と考えられている。また, 前述した favipiravir 併用時に methotrexate 誘発性肝障害を生じたという症例報告や, AOX による methotrexate 代謝と肝毒性の関連性を示唆する *in vitro* およびデータベース解析の結果もあり, methotrexate の肝局所的な毒性における AOX の関連も疑われる^{13,14)}。また第 1 章, 第 2 章に後述する通り, 免疫抑制剤である azathioprine および 6-mercaptopurine の代謝経路の一部にも AOX による酸化反応が寄与していることが報告された¹⁵⁾。

第 3 章に後述するように, AOX は補因子である molybdenum cofactor (Moco) 結合部位の近傍に位置する基質結合ポケットにおける酸化反応に加えて, flavin adenine dinucleotide (FAD) 結合ドメインにおける還元反応にも寄与している。筋弛緩薬 dantrolene による薬剤誘発性肝障害は, Food and Drug Administration (FDA) のブラックボックス警告にも分類される有害事象であるが, この原因代謝物は, dantrolene が AOX により還元され, 生成されることが報告されている¹⁶⁾。また AOX は, 電子密度の低いニトロ基を有するベンゾジアゼピン系薬剤 (clonazepam, flunitrazepam, nimetazepam, nitrazepam) や非ステロイド性抗アンドロゲン薬 (flutamide, nilutamide), 非ステロイド性抗炎症薬 (nimesulide) など多くの芳香族ニトロ化合物を認識し還元することで, 肝障害の原因物質であるヒドロキシルアミンを生成する^{17,18)}。以上より, 種々の医薬品の薬効および有害事象発現を予測する上で, AOX による酸化還元反応の重要性が高まりつつある。しかしながら, 長年のヒト肝ミクロソームを用いた代謝評価が薬物動態予測の中心であったことから, AOX の機能については未だ不明な点が多い。

上記の通り, AOX は新旧共に多くの医薬化合物の代謝に寄与する一方で, AOX を介した薬物間相互作用についてはエビデンスが不足しており, この相互作用に関する臨床

現場における重要性は未だ懐疑的である。Renwick らは、非ベンゾジアゼピン系睡眠薬 zaleplon から代謝産物 M2 への変換が, cimetidine により競合的に阻害され, $C_{\max}$ が 1.83 倍, AUC が 1.85 倍に増加することを見出し, この相互作用における AOX の関連性を報告した¹⁹⁾。しかしながら, cimetidine は CYP3A に対する阻害効果も有しており, また AOX に対する阻害効果は比較的弱いことから, AOX が原因か否かは定かではなかった。近年 Tang らによって, EGFR 阻害剤 erlotinib の併用による AOX 代謝経路の阻害が, c-KIT 阻害剤として開発された治験薬 OSI-930 の全身曝露量の増加と関連することが明らかにされた^{20,21)}。Erlotinib は時間依存的な AOX 阻害薬剤であり, その阻害速度定数と血漿中非結合型薬物濃度が同程度 (K_i : 0.719 μM) であるため, OSI-930 のように AOX が主要なクリアランス経路となる医薬品と併用する際には注意が必要と考えられる²²⁻²⁴⁾。このように AOX 介在性相互作用は示唆されているものの, 臨床研究や症例報告数も少なく, 有害事象や治療の転帰については検討されていない。また基礎的な検討に関する報告も限られており, その他の AOX 阻害薬剤や AOX 基質薬物に着目した詳細な検討が必要である。

また AOX の発現量および活性には個体間差が知られている。Fu らは LC/MS/MS による human AOX1 発現量絶対定量系を確立し, その測定系を用いて 20 の異なるロットの HLC 中 AOX1 発現量および AOX 基質化合物 carbazeran の酸化機能の差異を評価した²⁵⁾。その結果, AOX1 の発現レベルには最大 3.4 倍の差があり, carbazeran の固有クリアランスには 90 倍を超える差が検出された。したがって, AOX の発現量のみならず, AOX 代謝活性自体にも個体間差が存在すると考えられる。Single nucleotide polymorphisms (SNPs) は酵素活性に影響を及ぼす要因の一つであり, これまでに AOX1-SNPs と基質薬剤のクリアランスおよび治療効果との関連を示唆する臨床研究の結果が報告されている^{26, 27)}。しかしながら, SNPs の機能および臨床的な影響に関する報告は僅少であり, 実臨床において AOX1 遺伝子多型について, 考慮の要否については未だ不明である。

前述した背景を踏まえ, 本研究では, 使用頻度の高い AOX 基質薬物となるチオプリン系薬剤に着目し, AOX を介した薬物間相互作用の評価を目的とし検討を行った。また AOX の個体間差の解明を目的とし, 新規の human AOX1-nonsynonymous SNPs (nsSNPs) の同定を目指し検討を進めた。第 1 章では AOX 阻害に伴う azathioprine の副作用発現への影響について, 各種医薬品副作用自発報告データベースを用いた調査を行った。また第 1 章で得られた知見を踏まえ, 第 2 章ではチオプリン製剤の薬物動態に焦点を当て, AOX 阻害薬剤併用に伴う 6-MP の代謝変動について検討を行った。第 3 章では, 公開ゲノムデータベースを用いた nsSNPs の抽出, ならびに HEK293T 細胞強制発現系を使用した変異型 AOX1 (Mut AOX1) 機能解析を実施した。以上より, チオプリン製剤の薬物動態における AOX の重要性, ならびにテーラーメイド医療に向けた AOX の寄与および個体間差に関する有用な知見が得られたので, 以下に詳述する。

第1章 副作用自発報告データベースを用いた AOX 関連有害事象の調査

1.1 緒言

免疫抑制剤 azathioprine (AZA) はクローン病や潰瘍性大腸炎、関節リウマチの治療に用いられる代謝拮抗薬であり、その薬理活性は 6-mercaptopurine (6-MP) への代謝を介して産生される 6-thioguanine nucleotides (6-TGNs) に由来する。6-MP は 1) 転移酵素、リン酸化酵素による最終活性代謝物 6-TGNs, 2) メチル基転移酵素による 6-methyl mercaptopurine (6-MMP), 3) xanthine oxidase (XO) および AOX を介した 6-thioxanthine (6-TX), 6-thiouric acid (6-TUA) への酸化のいずれかの代謝を受けることが知られており、それぞれの律速酵素の存在量および活性が、産生代謝物比に伴って治療効果ならびに副作用発現に影響を与えると考えられている (Fig. 1)。

副作用である血液障害および肝毒性は、AZA による薬物治療の中断理由の主因であり、これら副作用の発現と各代謝物の量に相関があることが示唆されている^{28, 29)}。6-TGNs は活性代謝物であるため、血球細胞中の濃度が治療域を超えると、白血球減少を伴う過度な免疫抑制を引き起こす^{30, 31)}。6-MMP は不活性代謝物であるが、その血中濃度と肝障害の発現に相関があることが報告されている³²⁾。また 6-MMP への変換を担う thiopurine S-methyltransferase の遺伝子多型が治療効果および副作用発現と関連している^{33, 34)}。これらの複雑な代謝経路の理解が、チオプリン製剤による薬物治療を行う上で重要である一方で、チオプリン製剤による薬物治療を受ける患者の約 20–50 %が、予期せぬ代謝により有効治療濃度に達していないとする報告も存在する^{35, 36)}。近年、6-TGNs の活性型である thioguanine triphosphate の脱リン酸化を担う nudix hydrolase 15 (NUDT15) の遺伝子多型 (R139C [rs116855232], R139H [rs147390019]) が、チオプリン製剤の重篤な副作用に影響を与えることが報告された。特にシステインホモ接合体 (Cys/Cys) やヒスチジンとのヘテロ接合体 (Cys/His) では、thioguanine triphosphate 増加に伴う白血球減少ならびに脱毛症が顕著に発生することが知られている^{37, 38)}。この遺伝子多型は、アジア人集団に特異的に見られる変異であるため、その他の人種集団における白血球減少等の発生には関連していないと考えられる。以上より、正確なチオプリン製剤の副作用予測に向けた、種々の代謝経路の詳細な機能評価が必要と考えられる。

6-MP が酸化されて生成される 6-TUA は薬効、毒性的に不活性な代謝物である。XO 阻害剤である allopurinol 併用時には、6-TUA への代謝阻害に伴う 6-MP の増加により、副作用が増強すると考えられている。これまで、XO が 6-TUA への代謝を担うと考えられていたが、近年になって XO と近い配列を有する AOX も 6-MP の代謝に関連することが、*in vitro* の検討で明らかとされた¹⁵⁾。また AOX の遺伝子多型 (N1135S [rs55754655])

と AZA の治療効果低下との関連を示唆する症例報告もあり, AOX はチオプリン製剤の副作用発現とも関連する可能性がある^{39, 40)}. しかしながら AOX を介した薬物間相互作用等の報告は少なく, チオプリン製剤による臨床上的薬物治療における AOX の重要性については明らかとなっていない. そこで本章では, この AOX と AZA 誘発性有害事象の関連について調査するため, 各種副作用自発報告データベースを用い, 薬物間相互作用シグナルを評価した.

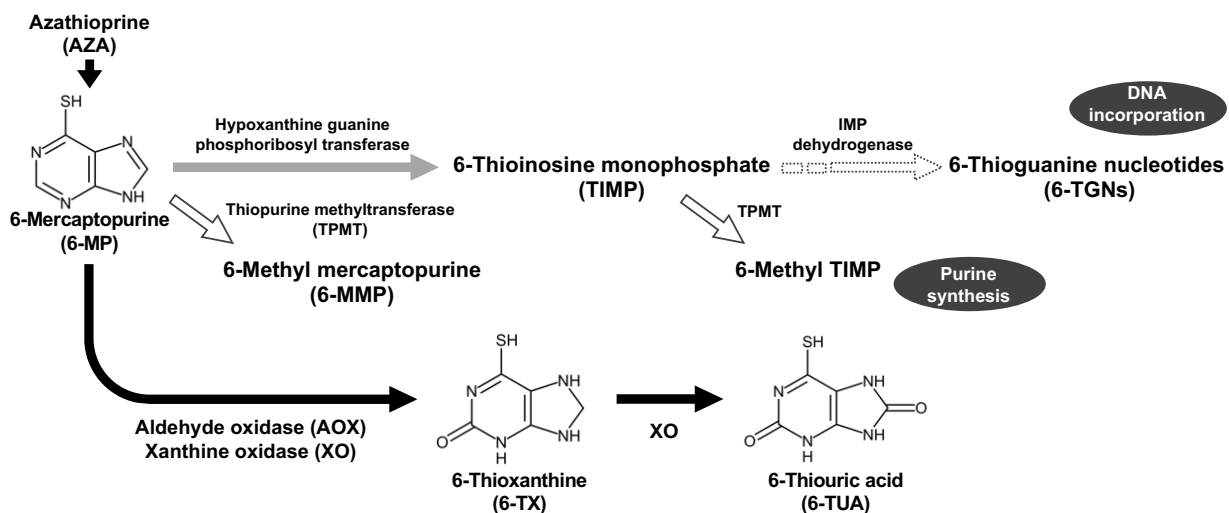


Figure 1 Anabolic and catabolic pathway of 6-mercaptopurine metabolism.

1.2 研究手法

1.2.1 調査対象データベースおよび対象調査期間

本研究では、本国の独立行政法人医薬品医療機器総合機構の収集している医薬品副作用データベース（英名: Japanese Adverse Drug Event Report database, JADER）および米国の FDA より提供されている FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) を調査対象データベースとした。また JADER より得られた副作用レポートは 2004 年 4 月から 2022 年 3 月までの全データを解析の対象とした。一方で、本検討では FAERS に登録されている副作用報告の内、薬剤の一般名が記載項目に追加されている 2014 年 7 月以降から 2021 年 12 月までのレポートを使用し、調査した。

1.2.2 解析手法および研究デザイン

データ解析は FAERS, JADER 共に、全て R software ver. 4.2.3 を使用し、以下の手順で同様に調査した。JADER は独立行政法人 医薬品医療機器総合機構の web サイト上 (<https://www.pmda.go.jp/safety/info-services/drugs/adr-info/suspected-adr/0003.html>) で公開されている一括データを、FAERS は FDA より公開されている四半期データ抽出ファイルを、2022 年 7 月にダウンロードして使用した (<https://www.fda.gov/drugs/questions-and-answers-fdas-adverse-event-reporting-system-faers/fda-adverse-event-reporting-system-faers-latest-quarterly-data-files>)。

データ処理の手順を以下に記載する (Fig. 2)。まず初めに、全てのデータの内、各報告に割り当てられている ID を参考に、重複する副作用レポートを除外した。同様の患者から複数報告されていると考えられる場合は、最も報告日時の新しい副作用報告のみを調査の対象とした。また FDA が web 上で公開する FAERS パブリックダッシュボードでは、重複等の種々の理由で一部の報告が削除されることがある。公開ダッシュボードと FAERS 四半期データ抽出ファイルの整合性を担保する目的で、2019 年第 1 四半期以降、それらの削除された報告の ID 情報が四半期データ抽出ファイルに添付されている。本検討ではこの “deleted files” に記載されている報告も除外して調査を実施した。

本研究における「AOX 阻害薬」は、AOX の代謝阻害効果を有することが知られている薬剤の内、各薬剤のインタビューフォームおよび添付文書に記載されている標準用量服用時の最高血中濃度 (C_{max}) を、既報における AOX の典型基質に対する阻害効果 (IC_{50}) で除した値を基に定義した⁴¹⁾。その際、以下の 5 つの条件に基づいて解析対象とする医薬品を選定した; i) FDA あるいは厚生労働省より承認を受けた薬剤であること、ii) 生体内で合成される化合物ではないこと、iii) 主に肝代謝を考慮するため、投与経路が経口あるいは静脈内注射等の全身作用を期待するものであり、経鼻や経皮など局所作用を示すものではないこと、iv) 2023 年 3 月迄に市場に流通しているもの、v) 解析す

るにあたり副作用報告件数が担保される薬剤であること (Table 1).

Table 1 The ratio of AOX inhibitory effects to clinical blood concentrations.

Compounds	C _{max} (μM)		IC ₅₀ (μM)	C _{max} /IC ₅₀
Raloxifene	0.0034	(For women receiving 60 mg/day for 14 days)	0.0029	1.18
Chlorpromazine	0.47	(For patients receiving 100 mg/day for 30 days)	0.57	0.82
Clozapine	3.49	(For patients receiving 300 mg/day for 8 days)	4.4	0.79
Amitriptyline	0.14	(For patients receiving 75 mg/day for more than 14 days)	0.26	0.53
Quetiapine	0.45	(For patients receiving 200 mg/day for more than 3 days)	1.4	0.32
Clomipramine	0.08	(For adult volunteers receiving 50 mg)	0.48	0.16
Tamoxifen	0.20	(For patients receiving 20 mg/day for 28 days)	2.2	0.09
Nortriptyline	0.06	(For adult volunteers receiving 25 mg)	0.85	0.07
Promethazine	0.03	(For adult volunteers receiving 75 mg)	0.51	0.07
Felodipine	0.02	(For adult volunteers receiving 5 mg)	0.30	0.06
Verapamil	0.18	(For adult men receiving 80 mg)	3.5	0.05
Cyclobenzaprine	0.09	(For adult volunteers receiving 10 mg)	3.1	0.03
Loratadine	0.01	(For adult volunteers receiving 10 mg)	0.49	0.02
Olanzapine	0.09	(For adult volunteers receiving 5 or 10 mg/day for 8 days)	6.0	0.01
Ondansetron	0.03	(For adult volunteers receiving 4 mg)	2.1	0.01
Domperidone	0.03	(For adult volunteers receiving 10 mg)	3.0	0.01
Metoclopramide	0.18	(For adult volunteers receiving 20 mg)	31	0.01
Amlodipine	0.01	(For adult men receiving 5 mg)	5.5	0.00
Loperamide	0.00	(For adult volunteers receiving 2 mg)	10	0.00

IC₅₀ values were based on previously reported phthalazine oxidation assays ⁴¹⁾.

Blood concentrations were obtained from the package inserts of each drug.

AOX の基質薬剤の内, 本研究では AOX の代謝における関連が示唆されている AZA について肝臓における毒性を調査した. また AOX の遺伝子多型と免疫抑制による治療効果との関連性が報告されていることから, 薬剤効果と相関して現れる有害事象である血液毒性についても調査を行った. JADER, FAERS 共に, 有害事象は Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA) に収録されている副作用用語の基本語 (Preferred Terms: PT) レベルで報告されている. そこで MedDRA/J version 25.0 を参照し, PT を特定の疾病や医学的状态でグループ化した MedDRA 標準検索式 (SMQ) を対象として解析した. 具体的には血液障害の評価セットとして “hematopoietic cytopenias” (SMQ: 20000027), 薬物誘発性の肝障害の評価セットとして “drug-related hepatic disorders” (SMQ: 20000006) を対象とした. JADER の場合は, AZA が「被疑薬」とされている副作用報告を対象として薬剤誘発性の有害事象を検索した. FAERS については “Primary suspected drug: PS” あるいは “Secondary suspected drug: SS” と記載されている報告を対象とした.

1.2.3 副作用シグナル検出

不均衡分析のシグナルとして、副作用自発報告データベース解析で指標とされることの多い報告オッズ比 (Reporting odds ratio: ROR) およびその 95%信頼区間 (95% confidence interval: 95% CI) を算出した⁴²⁾. ROR, 95% CI はそれぞれ以下の式により算出した (Eq. (1)–(2)). 得られた ROR および 95% CI を基に、既報を参考に以下の条件を満たす場合をシグナル陽性と定義した; i) ROR 算出に使用した副作用報告件数が 3 件以上である, ii) AZA と AOX 阻害薬を併用した際の ROR ($ROR_{AZA \cap AOX \text{ inhibitor}}$) が 1 以上である, iii) $ROR_{AZA \cap AOX \text{ inhibitor}}$ の下限が, AZA 単独 (ROR_{AZA}) および AOX 阻害薬単独 ($ROR_{AOX \text{ inhibitor}}$) で算出した際の ROR の上限の数値以上である. また, ROR は副作用報告件数が少ない場合に過大評価する危険性がある. そこで本検討では, 上記のシグナル検出条件を定める際に, 保守的な結果が得られるよう報告数の下限値を設定している^{43–45)}.

またシグナル陽性と判断された薬剤に関しては, より偽陽性の少なく WHO Uppsala Monitoring Centre でも採用されている Ω shrinkage measure model を用いて再検証した^{45, 46)}. Ω 値は正規分布に従うと仮定し, $\Omega_{0.25}$ 値は既報に基づき以下の式により算出した (Eq. (3)–(5)). ここで n_{111} は AZA および特定の AOX 阻害薬を併用している際の対象副作用報告数であり, E_{111} はその期待値を示している. また $\text{Var}(\Omega_0)$ は Ω 値の分散, $\phi(0.975)$ は標準平均分布の 97.5% 分位点を示す. Ω shrinkage measure model を採用し副作用データベース解析を行った先行研究を参照し, 本研究においても, 得られた $\Omega_{0.25}$ 値が 0 より大きい場合 (95% CI を含めた Ω 値が 0 を上回る場合) に相互作用シグナル陽性と判断した.

$$ROR = \frac{\frac{\text{対象医薬品以外における評価対象副作用の報告件数 } (N_{01})}{\text{対象医薬品以外におけるその他副作用の報告件数 } (N_{00})}}{\frac{\text{対象医薬品における評価対象副作用の報告件数 } (N_{11})}{\text{対象医薬品におけるその他副作用の報告件数 } (N_{10})}} \quad (1)$$

$$95\% \text{ CI} = \exp \left\{ \log(ROR) \pm 1.96 \sqrt{\left(\frac{1}{N_{11}} \right) + \left(\frac{1}{N_{10}} \right) + \left(\frac{1}{N_{01}} \right) + \left(\frac{1}{N_{00}} \right)} \right\} \quad (2)$$

$$\Omega = \log_2 \frac{n_{111} + 0.5}{E_{111} + 0.5} \quad (3)$$

$$\text{Var}(\Omega_0) = \text{Var} \left(\log_2 \frac{n_{111}}{E_{111}} \right) \approx \frac{1}{n_{111} \log(2)^2} \quad (4)$$

$$\Omega_{0.25} = \Omega - \frac{\phi(0.975)}{\log(2) \sqrt{n_{111}}} \quad (5)$$

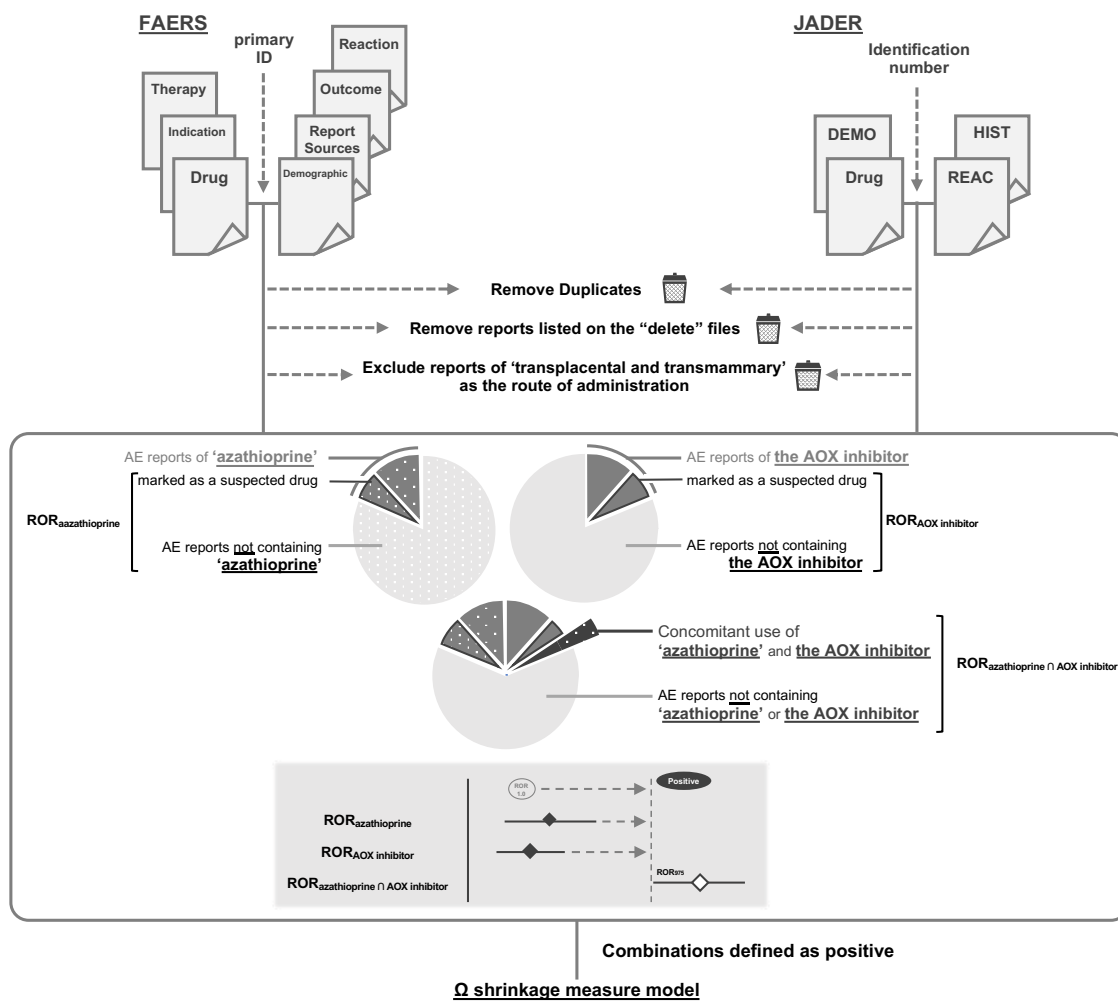


Figure 2 Adverse effects database analysis procedure.

1.3 結果

1.3.1 血液障害に関連する副作用報告の不均衡解析

AZA を被疑薬とする PT 数は, FAERS および JADER において, それぞれ 98,419 件および 4,713 件であった. FAERS では AZA を被疑薬とする血液障害の ROR [95% CI] は 1.81 [1.75–1.87] であった. また AZA と各 AOX 阻害薬を併用している患者における ROR は次のようになった (Fig. 3): amlodipine (ROR: 3.26 [95% CI: 2.72–3.91]), chlorpromazine (47.92 [26.35–87.14]), clozapine (15.69 [10.73–22.93]), cyclobenzaprine (5.07 [3.48–7.38]), felodipine (4.16 [2.88–6.00]), hydralazine (6.28 [3.60–10.94]), loratadine (4.15 [2.63–6.55]), metoclopramide (3.59 [2.70–4.76]), olanzapine (13.80 [9.54–19.95]), ondansetron (2.61 [2.01–3.39]), quetiapine (5.70 [4.40–7.38]). また FAERS において Ω shrinkage measure model では以下の組み合わせのシグナルが検出された: amlodipine (Ω_{025} : 0.58), chlorpromazine (2.82), clozapine (0.25), cyclobenzaprine (0.86), felodipine (0.61), hydralazine (0.82), loratadine (0.47), metoclopramide (0.54), olanzapine (1.99), quetiapine (1.20) であった (Table 2).

JADER では, AZA の ROR は 2.77 [2.59–2.97] であり, amlodipine との併用 (5.21 [3.64–7.47]) で陽性と判定された (Fig. 4). Figure 4 に記載されていない薬剤は, AZA と併用した場合の報告症例数が少ないため, 不均衡解析の対象外とした.

1.3.2 肝障害に関連する副作用報告の不均衡解析

FAERS では AZA を被疑薬とする肝障害の ROR [95% CI] は 2.28 [2.20–2.36] であった. また各 AOX 阻害薬の内, clozapine (5.67 [3.07–10.48]) および ondansetron (7.90 [6.54–9.53]) の組み合わせにおいてシグナルが検出された (Fig. 5). また Ω shrinkage measure model においても, 同じく clozapine (Ω_{025} : 0.32), ondansetron (1.23) においてシグナル陽性と判断された (Table 3). JADER では AZA の ROR は 1.25 [1.11–1.40] であり, hydralazine との併用 (5.33 [1.74–16.35]) で陽性と判定された (Fig. 6).

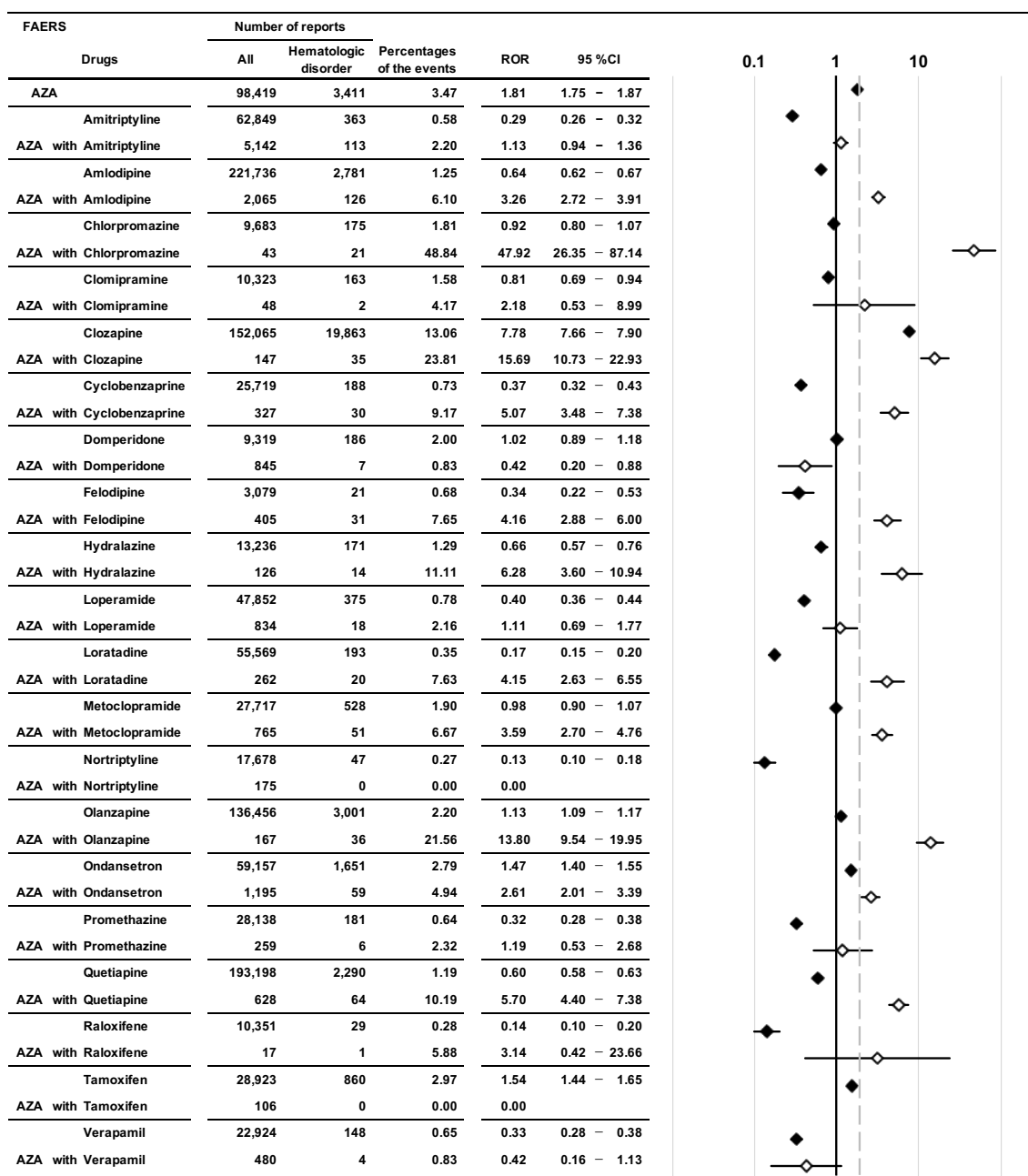


Figure 3 The number of reports and ROR for the hematological disorders from FAERS. The dotted gray line represents upper limit of ROR_{AZA} score. ROR_{AZA} and each $ROR_{AOX \text{ inhibitor}}$ scores were expressed as filled square, and $ROR_{AZA/AOX \text{ inhibitor}}$ scores were expressed as open square.

Table 2 Drug combinations with hematologic disorder signals detected using the Ω shrinkage measure model in the FAERS analysis.

Combination of drugs			Number of reports		Ω	$\Omega_{0.25}$
			Hematologic disorder	Other adverse effects		
AZA	with	Amlodipine	126	1939	0.84	0.58
AZA	with	Chlorpromazine	21	22	3.82	2.82
AZA	with	Clozapine	35	112	0.74	0.25
AZA	with	Cyclobenzaprine	30	297	1.41	0.86
AZA	with	Felodipine	31	374	1.15	0.61
AZA	with	Hydralazine	14	112	1.68	0.82
AZA	with	Loratadine	20	242	1.14	0.47
AZA	with	Metoclopramide	51	714	0.95	0.54
AZA	with	Olanzapine	36	131	2.55	1.99
AZA	with	Quetiapine	64	564	1.57	1.20

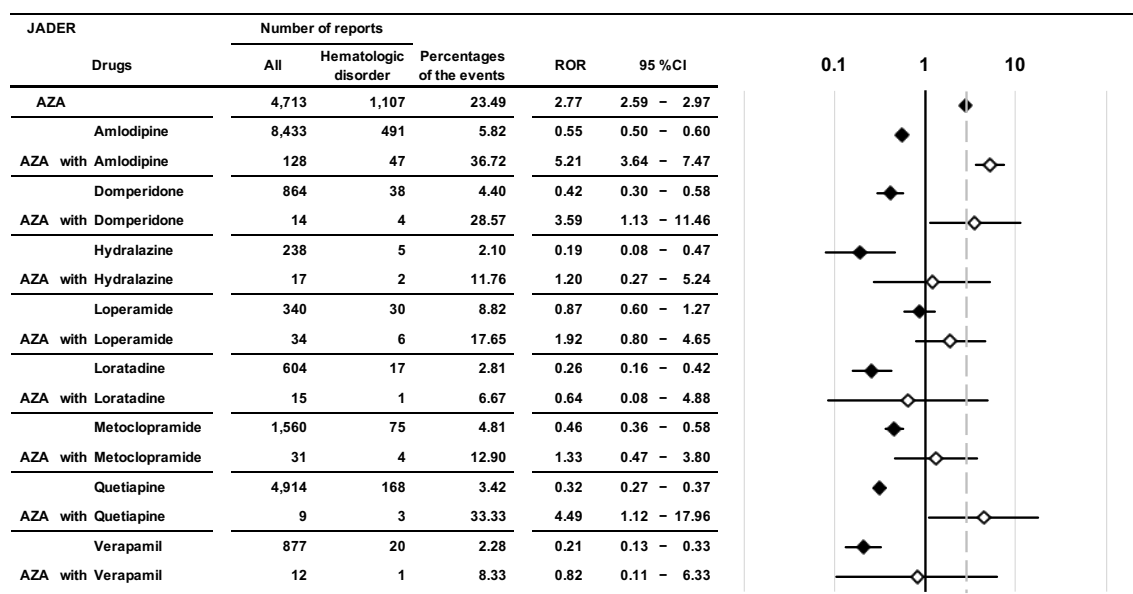


Figure 4 The number of reports and ROR for the hematological disorders from JADER. The dotted gray line represents upper limit of ROR_{AZA} score. ROR_{AZA} and each $ROR_{AOX \text{ inhibitor}}$ scores were expressed as filled square, and $ROR_{AZA \cap AOX \text{ inhibitor}}$ scores were expressed as open square.

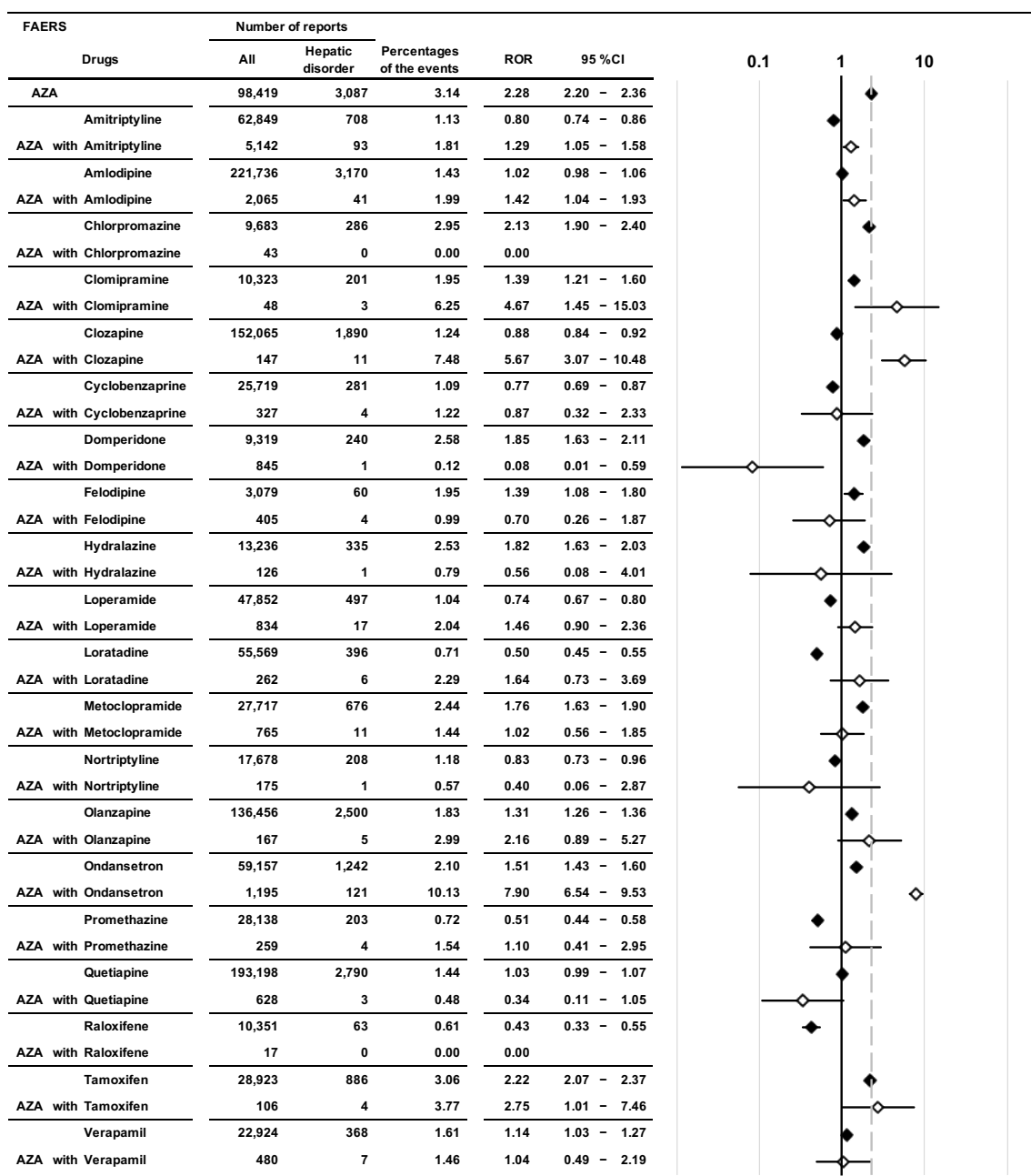


Figure 5 The number of reports and ROR for the hepatic disorders from FAERS. The dotted gray line represents upper limit of ROR_{AZA} score. ROR_{AZA} and each $ROR_{AOX \text{ inhibitor}}$ scores were expressed as filled square, and $ROR_{AZA \cap AOX \text{ inhibitor}}$ scores were expressed as open square.

Table 3 Drug combinations with hepatic disorder signals detected using the Ω shrinkage measure model in the FAERS analysis.

Combination of drugs	Number of reports		Ω	Ω_{025}
	Hepatic disorder	Other adverse effects		
AZA with Clozapine	11	136	1.17	0.32
AZA with Ondansetron	121	1074	1.49	1.23

JADER		Number of reports		Percentages of the events	ROR	95 %CI	0.1	1	10
Drugs	All	Hepatic disorder							
AZA	4,713	316	6.70	1.25	1.11 - 1.40				
Amlodipine	8,433	792	9.39	1.82	1.69 - 1.96				
AZA with Amlodipine	128	6	4.69	0.85	0.38 - 1.93				
Domperidone	864	135	15.63	3.22	2.68 - 3.87				
AZA with Domperidone	14	0	0.00	0.00					
Hydralazine	238	13	5.46	1.00	0.57 - 1.75				
AZA with Hydralazine	17	4	23.53	5.33	1.74 - 16.35				
Loperamide	340	26	7.65	1.44	0.96 - 2.14				
AZA with Loperamide	34	2	5.88	1.08	0.26 - 4.52				
Loratadine	604	88	14.57	2.96	2.36 - 3.71				
AZA with Loratadine	15	1	6.67	1.24	0.16 - 9.41				
Metoclopramide	1,560	86	5.51	1.01	0.81 - 1.26				
AZA with Metoclopramide	31	1	3.23	0.58	0.08 - 4.24				
Quetiapine	4,914	234	4.76	0.87	0.76 - 0.99				
AZA with Quetiapine	9	0	0.00	0.00					
Verapamil	877	69	7.87	1.48	1.16 - 1.89				
AZA with Verapamil	12	2	16.67	3.47	0.76 - 15.82				

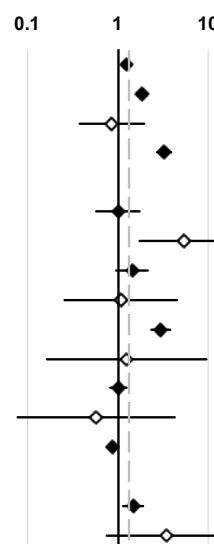


Figure 6 The number of reports and ROR for the hepatic disorders from JADER. The dotted gray line represents upper limit of ROR_{AZA} score. ROR_{AZA} and each $ROR_{AOX \text{ inhibitor}}$ scores were expressed as filled square, and $ROR_{AZA \cap AOX \text{ inhibitor}}$ scores were expressed as open square.

1.4 考察

AOX に関連する臨床研究は数少ないが、前述の通り AZA においては AOX の遺伝子多型との直接的な関連性を示唆する報告があることから、本検討では AZA の副作用報告に着目し調査を実施した^{39, 40)}。AZA が被疑薬とされる副作用の総数の内、本検討で定義した血液障害および肝障害の占める割合は、FAERS と JADER で乖離が見られた。JADER では血液障害 (SMQ: 20000027) に含まれる報告の割合が 23.49 %と高値であったのに対し、FAERS では 3.47 %にとどまった。この差違は、各データベースにおける副作用報告 1 件あたりの PT 数の違いが原因と考えられる。一般的に JADER と比較して FAERS では、症例 1 報告あたりに含まれる有害事象数が多いことが知られている。そのため FAERS においては、血液障害以外の副作用報告数が過多であることから、相対的に血液障害の割合が低く見積もられている可能性がある。また血液障害は AZA の薬理活性と直接的な相関のある有害事象であるため、JADER においても報告数が多く、また他の薬剤と併用した際の薬物動態学的な影響が現れやすい副作用であると考えられる。

AOX の阻害薬剤は多く知られているが、本検討では、各薬剤の阻害効果を単一の評価系にて評価していることから、Obach らの報告を参照し、その IC₅₀ 値を基に選出している⁴¹⁾。それぞれの IC₅₀ は AOX の典型基質 phthalazine から phthalazone への酸化反応に対する阻害効果から算出されたものであるが、AOX の阻害剤として知られている hydralazine はそれ自体が代謝され phthalazone へと変化することから、Obach らの報告には含まれていない⁴¹⁾。しかしながら、その他基質を用いた時に強い阻害効果を有することや、ラットに投与した際の AOX 阻害効果が示唆される報告もあることから、本検討では AOX の阻害薬剤の一つとして解析を行った^{25, 47)}。

本検討では各薬剤のインタビューフォームを参照し、その C_{max} を基に阻害強度 (C_{max}/IC₅₀) を推定した (Table 1)。この推定値が高い薬剤は、臨床における薬物治療濃度域において AOX を阻害し得ると考えられる。臨床的な AOX 阻害効果が示唆される薬剤群 (C_{max}/IC₅₀ > 0.1)⁴⁸⁾において、chlorpromazine, clozapine, hydralazine, quetiapine は ROR score および Ω score 共に、AZA 関連血液障害の報告数が増加した。しかしその一方で、raloxifene および amitriptyline, clomipramine では相互作用シグナルが検出されなかった。Raloxifene は AOX の強力な阻害薬剤として知られている。しかしながら、血漿蛋白との結合率は 96.6–98.5% と高いことから、肝細胞中において AOX を阻害し得る濃度の未変化体が存在しない可能性が考えられる。また、Amitriptyline も臨床治療濃度において AOX を阻害すると推定される薬剤である。FAERS における自発報告には患者背景が記載されており、一部の報告には被疑薬の投与量および用法に関する情報が含まれている。そこで AZA と amitriptyline を併用している報告に着目し、血液障害発生群とそれ以外の報告群における amitriptyline の服用量を調査した。その結果 amitriptyline を 75 mg/day で服用した報告の割合は、血液障害発生群において非発生群より高く (39.5%

vs 10.7%), 両群共に投与量が 75 mg/day を超える報告は存在しなかった. Table 1 に記載している amitriptyline の血中濃度は, 75 mg/day 服用時の数値を参考に行っていることから, 本検討に含まれる自発報告では, AOX を阻害し得る程度の amitriptyline 服用例が少ないことが示唆された. Table1 では, 特定の薬剤服用量における最高血中濃度を参考に AOX 阻害薬を定義しているが, 実臨床では薬剤の服用量によって阻害効果は異なる. また本検討では, AOX 基質と阻害薬剤の相互作用という観点で調査を行ったが, 実際には種々の薬物動態学および薬理学的な相互作用, 副作用報告では判断出来ない個体間差が副作用発現に影響を与えている. 緒言でも述べた XO 阻害薬剤 allopurinol は, 6-MP 酸化の抑制に加え, 6-MMP/6-TG 比を変化させることで, 肝障害の発現や治療効果などの薬剤応答性に影響を与えることが報告されている. このメカニズムは不明だが, allopurinol 自体が TPMT によるメチル化等の, その他の代謝経路に影響を与えている可能性がある⁴⁹⁾. 今回着目した AOX 阻害薬についても, AOX 以外の代謝酵素や輸送体に対する影響も考慮する必要がある.

副作用自発報告データベースによる報告頻度を評価する際, 一般的に ROR および proportional reporting ratio (PRR) をシグナル検出アルゴリズムに採用することが多い. それぞれ Eudra Vigilance, Lareb データベースの解析で採用されている手法であるが, 算出式の分母の扱いが異なるのみで, その検出精度は同等と考えられることから, 本検討では ROR を用いて評価した. またシグナルの検出基準を設定するにあたり, 偽陽性を減らすためにも副作用報告数の下限値を設定している. しかしながら報告数の多少は ROR の過大評価の原因となるため, ROR の数値自体が副作用の発現頻度と直接関連するものではないことに注意が必要である. より保守的な解析を行う上では, 検出アルゴリズムを複合することの重要性が示唆されており, 本検討では ROR と Ω shrinkage measure model を使用した⁵⁰⁾.

上記の結果より, AOX 阻害薬が AZA による副作用頻度を増加させる可能性が示された. 副作用データベースは臨床研究と比較し観測できる事例報告数が多く, またさまざまな薬剤について後方視的に検討可能である. しかしながら, そのデータの特徴や煩雑性から limitation も多い. FAERS および JADER には副作用が発現していない報告が存在しないので, オッズ比自体を算出することは不可能であり, 副作用発現リスクについては言及できない. また被疑薬と併用薬は報告者の判断で区別して集約されており, 薬剤の用法用量や服用期間についても報告者に委ねられるため, 患者背景が欠落している報告も多い. 加えて最も重要な点として, 本検討では AZA あるいは AOX 阻害薬剤単剤の ROR と比較して, 併用により ROR が上昇した場合にシグナル陽性と判断しているが, そもそも clozapine 等はそれ自体が血液障害や肝障害のリスクとなることが知られているため, 一概に相加効果あるいは相乗効果を判断することは難しいことが挙げられる. 今後, より正確な AOX を介した薬物間相互作用の解明に向け, *in vitro* および *in vivo*, また臨床研究により知見を深める必要がある.

1.5 小括

臨床血中濃度において AOX を阻害すると推定される薬剤の併用により, AZA 誘発副作用の報告数が増加することが示された. これまでに AZA と AOX 阻害薬剤間の関連に着目した報告は皆無であり, AOX を介した薬物間相互作用についてリアルワールドデータを用いて評価した初めての研究である. 本調査結果を踏まえ, AZA 治療におけるこの相互作用の影響を明らかにするためにも, より詳細なメカニズムの検証が必要である.

第2章 6-MP 代謝における各種 AOX 阻害薬剤による薬物動態変動

2.1 緒言

6-MP は 1940–50 年代に白血病治療薬として George Herbert Hitchings, Gertrude Belle Elion 教授らにより発見, 開発された医薬品であり, その後 1960 年代に 6-MP のプロドラッグである AZA が開発された. AZA は glutathione S-transferase により, あるいは非酵素的に速やかに 6-MP に変化することから, 薬理活性および副作用発現に関連する薬物動態は AZA と 6-MP で同等と考えられる. AZA による用量非依存的な副作用として, 悪心, 嘔吐などの消化器障害や膵炎が知られており, また膵炎については, HLA class II におけるアレル (rs2647087) が AZA 誘発性膵炎の発症リスクに関連することも報告されている⁵¹⁾. これらの有害事象は AZA のイミダゾール由来のアレルギー反応であり, 本法では保険適応外ではあるが 6-MP に変更することで治療継続可能となる場合が多い. 一方, 第1章で着目した血液障害や AZA 代謝物増加に伴う肝障害は用量依存的な副作用であり, これら有害事象にはチオプリン製剤の薬物動態が深く関連している. 6-MP が開発され半世紀以上経つが, その代謝経路の複雑さから未だ全貌は解明されていない. 前述の通り, 近年になって NUDT15 とチオプリン製剤による脱毛, 骨髄抑制の関連が発見されたが, NUDT15 遺伝子多型を有していない患者でも骨髄抑制を呈する例も多く, またこの遺伝子多型のみでは肝障害等の副作用を予測できないことから, その他の代謝酵素を含めた網羅的な薬物動態機構の解明が必要である.

6-MP の不活性代謝物 6-TUA への変換には, 主に腸管, 肝臓に発現する XO が関連しており, XO 阻害薬の allopurinol は, 大幅にチオプリン製剤のバイオアベイラビリティを上昇させ, 6-MP の薬理活性および骨髄抑制などの副作用発現を増加させることが知られている. また同様の理由により, XO 阻害剤である febuxostat および topiroxostat は, チオプリン製剤と併用禁忌とされている. Hall, Krenitsky らは, ウサギ肝臓より得られた AOX が 6-MP を基質として認識することを発見し, その後に Rashidi らは guinea pig liver cytosol を用いた検討により, AOX の阻害剤である menadione および chlorpromazine が 6-MP の酸化を阻害することを報告している^{52,53)}. 6-MP は 6-TX を経て 6-TUA へと代謝されており, guinea pig の肝臓中では後者の 6-TX から 6-TUA への酸化に AOX が関連すると推測されている. Guinea pig では前者の 6-MP から 6-TX への反応を担う XO による酸化反応が律速であったことから, 本経路における AOX の寄与は小さいと考えられていた. しかしながら後に Choughule らにより, HLC では 6-MP から 6-TX への代謝に AOX が寄与していることが報告された¹⁵⁾. そこで本章では, 第1章でも着目した実臨床でも使用される各種 AOX 阻害薬剤による, 6-MP 不活性経路への影響およびそのメカニズムの解明を目的として, *in vitro* および *in vivo* の検討を行った.

2.2 実験手法

2.2.1 試薬

XTreme200 pooled human liver cytosol (HLC), pooled Wistar male rat liver cytosol (pooled RLC) は Xenotech (Kansas City, MO, USA) から, recombinant XO は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) から購入した. Amitriptyline, 6-MP は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から, 2-amino-6-mercaptopurine- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N , 6-TX は Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada) より入手した. 6-TUA は BIOSYNTH (Compton, UK) から, 6-carboxyfluorescein, clozapine, febuxostat, hydralazine, quetiapine, raloxifene は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) から, chlorpromazine, clomipramine は FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan) より購入した. ラットは株式会社ホクドーより購入した Jcl:Wistar 雄性ラットを用いた. その他の試薬は特に断らない限り特級もしくは生化学用, 分子生物学用のものを用いた.

2.2.2 HLC における 6-MP 代謝評価

25 mM sodium phosphate buffer にて終濃度 0.5 mg/mL となるよう調製した HLC を 3 分間プレインキュベーションした後, 6-MP を添加することで酸化反応を評価した. 反応液中の dimethyl sulfoxide (DMSO) の最終濃度は 0.1% 以下とし, 最終反応液量が 50 μL となるよう調製した. 一定時間反応後, 内部標準として反応液量と等量の 200 ng/mL 2-amino-6-mercaptopurine- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N を含む acetonitrile を添加し反応を停止させた. 反応液中の 6-MP の濃度は, 50–400 μM , 反応時間は 5–90 min として検討を行った. また, 各種阻害剤添加時の反応条件は, 6-MP の濃度を 100 μM , 反応時間を 15 min とした. Febuxostat ならびに各種 AOX 阻害剤は 1 nM–100 μM にて阻害効果を検討した後, febuxostat と AOX 阻害薬剤併用時には各種阻害剤を 5 μM (raloxifene のみ 100 nM) となるよう添加した. 反応終了後のサンプルは, 遠心分離した後 (16,000 g, 15 min, 4°C), 上清 10 μL を UPLC-MS/MS に注入し, 6-TX の生成量を定量した.

6-TX の定量には Waters ACQUITY UPLC H-Class System および Xevo TQ-S mass spectrometer (Waters Corporation, Milford, MA, USA) を用いた. 注入されたサンプルの分離には Waters ACQUITY UPLC BEH C18 column (1.7 mm, 2.1 $\times$ 100 mm) を使用し, カラム温度を 40°C, 流速を 0.4 mL/min とした. 移動相には 0.3% formic acid, 0.02 M ammonium acetate in water (mobile phase A) および acetonitrile (mobile phase B) を使用し, 次のグラジエント条件で送液した: 90% A for 0.1 min, 90–10% A from 0.1 to 1.0 min, and 10%–90% A from 1.0 to 1.5 min, 90% A until 2 min. 液体クロマトグラフィーより分離された化合物は

ESI negative mode にてイオン化した後 Xevo TQ-S mass spectrometer にて検出した. 質量電荷比ならびに declustering potential (DP), collision energy (CE) は以下の通りである: m/z : 167.23 > 133.00 for 6-TX (DP: 44, CE: 16); 169.27 > 135.05 for 2-Amino-6-mercaptopurine- $^{13}\text{C}_2$, ^{15}N (DP: 46, CE: 14).

2.2.3 recombinant XO における 6-MP 代謝評価

25 mM sodium phosphate buffer を用いて終濃度 0.015 unit/mL となるよう調製した recombinant XO に 6-MP を添加することで酸化反応を評価した. 反応液中の DMSO の最終濃度は 0.1% 以下とし, 最終反応液量が 100 μL となるよう調製した. 反応液中の 6-MP の濃度は, 1–100 μM , 反応時間は 10–60 min として検討を行った. また, 各種阻害剤添加時の反応条件は, 6-MP の濃度を 5 μM , 反応時間を 30 min として, febuxostat ならびに各種 AOX 阻害薬剤は 1 nM–100 μM となるよう添加した. 一定時間インキュベートした後, 10 % HCl を 10 μL 添加することで反応を停止させた. 反応終了後のサンプルは, 遠心分離した後 (16,000 g, 15 min, 4°C), 上清 30 μL を測定に用いた. 6-TUA の定量には Waters ACQUITY UPLC H-Class System を用いた. 注入されたサンプルの分離には Waters ACQUITY UPLC BEH C18 column (1.7 mm, 2.1 $\times$ 50 mm) を使用し, カラム温度を 30°C, 流速を 0.6 mL/min とした. 移動相として 20 mM potassium phosphate 溶液を用いてアイソクラティック溶出を行った. 照射波長を 342 nm とした際に, 6-MP (retention time: 1.2 min), 6-TUA (0.6 min), 6-TX (1.6 min) にピークが得られることを確認した.

2.2.4 ラットにおける 6-MP 血中動態評価

購入した Jcl:Wistar 雄性ラットは湿度 50 $\pm$ 10% 内, 12 時間ごとの明暗環境において, 自由摂食, 自由摂水条件下で飼育し, 7 週齢の時点で実験に用いた. ラットはセボフルランで維持麻酔を行い, 27G 針を用いて hydralazine 10 mg/kg を大腿静脈に投与しすぐに止血した. 続いて 25G 針を用いて 6-MP 20 mg/kg を腹腔内に投与した. 6-MP 投与後, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 240 min, 360 min の時点で, 25G 針を用いて頸静脈より血液を 300 μL 採取した. 採取した血液は直ちにヘパリンナトリウム (4 Unit) と混合し, 1,200 g, 20 min, 4°C で遠心分離し, 得られた上清を血漿サンプルとして用いた. なおサンプルは測定まで -30°C で保管した. 血中 6-MP の測定条件として, 血漿を acetonitrile および trifluoroacetic acid で除蛋白質後, dithiothreitol を添加し加熱処理を行った. 処理後のサンプルを遠心分離し, その上清中の 6-MP 濃度を UPLC-MS/MS にて測定した. 使用カラムおよび送液条件は 2.2.2 と同様であり, ESI positive mode でイオン化を行った. また 6-MP の質量電荷比は 153.05 > 119.08, DP/34, CE/20 で定量を行った.

2.2.5 Rat liver cytosol (RLC) における 6-MP 代謝評価

Xenotech 社より購入した pooled RLC およびホクドーより購入した 7 週齢 Jcl:Wistar ラットより採取、抽出した RLC (extracted RLC) を使用し検討を行った。ラット肝臓は、門脈より PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄) を還流、脱血した後に、組織の一部を 50 mM Tris HCl, 150 mM KCl, 2 mM EDTA (pH7.4) 緩衝液に懸濁させ、ホモジナイザーおよび超音波で剪断した。得られた肝臓組織懸濁液を 9,000 g, 20 min, 4°C の条件下で遠心分離した後、得られた上清をさらに 105,000 g, 60 min, 4°C の条件で超遠心分離することで得られたサイトゾル画分を使用した。

2.2.6 Organic anion transporter (OAT) を介した 6-CF 輸送実験

Human OAT1, 3 安定発現 HEK293 細胞を用い、培養は非働化した fetal bovine serum (FBS) を 10% 添加した DMEM high glucose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 中で、37°C, 5% CO₂ で行った。継代は PBS で 2 回洗浄後、trypsin 溶液 (0.25% trypsin, 0.02% EDTA, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄) で細胞を剥離し行った。

Human OAT1 および human OAT3 安定発現 HEK293 細胞を、コラーゲン処理した 24 well プレートに 2×10⁵ cells/well の濃度で播種し、その 2 日後に取り込み実験を行った。基質として 6-carboxyfluorescein (6-CF; 0.5 μM)、阻害剤として 6-MP (10 nM–100 μM) あるいは hydralazine (10 nM–100 μM) を添加した緩衝液を含んだ Hanks' balanced salt solution buffer (HBSS) を 500 μL 添加し、一定時間 3 min 取り込ませた。なお各化合物は DMSO で溶解し、DMSO の終濃度が 0.1 % 以下になるように調製した。その後氷冷した HBSS buffer 1,000 μL により 2 回洗浄し、底面の細胞を 0.5 N NaOH 溶液 500 μL で回収した。細胞懸濁液は 1,100 g で 1 min 遠心分離し、上清 100 μL を 96 穴ブラックプレートに移し、蛍光強度を測定した（励起波長/蛍光波長: 490/520 nm）。タンパク定量は BSA (bovine serum albumin) を標準タンパクとして BCATM protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて行った。

2.2.7 数値解析

速度論解析には SigmaPlot 14.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA) を用いた。統計解析は unpaired Student's t test による 2 群間の比較における有意差の検定を行った。いずれの場合も $p < 0.05$ を統計学的に有意であると判定した。

2.3 結果

2.3.1 各種 AOX 阻害薬剤の HLC における 6-MP 代謝阻害効果

HLC 中において、6-TX は 90 min まで直線的に生成されることが確認された (Fig. 7). また基質である 6-MP 濃度に比例して、6-TX の生成速度が増加することが明らかとなった. 6-TX はサイトゾル中でさらに 6-TUA へと変換されるが, Choughule らは HLC を用いた 6-MP の酸化反応実験において、6-TX の反応液中の濃度が定常状態程度に達した時点から、急激に 6-TUA が生成されており、ここで反応開始後 15 min までは 6-TUA がほとんど検出されないことを報告している¹⁵⁾. これは 6-MP が XO あるいは AOX の基質ポケットに結合し酸化反応を受け 6-TX に変換された後、そのまま 6-TUA に代謝されるのではなく、一度結合部位から離れ、別の酸化を受ける部位が再度 XO の結合ポケットに入り込む必要があることを示唆している. 本検討では反応時間を 15 min とし、6-MP から 6-TX の酸化反応における、AOX および XO の寄与を評価した. 各種 AOX 阻害薬剤はその濃度依存的に 6-TX の産生を阻害した (Fig. 8). 次に febuxostat と各種 AOX 阻害薬剤を同時に添加した際に、6-TX の産生が強く阻害された (Fig. 9). その阻害効果は、各種 AOX 阻害薬剤単剤の 6-TX 生成阻害効果と相関した.

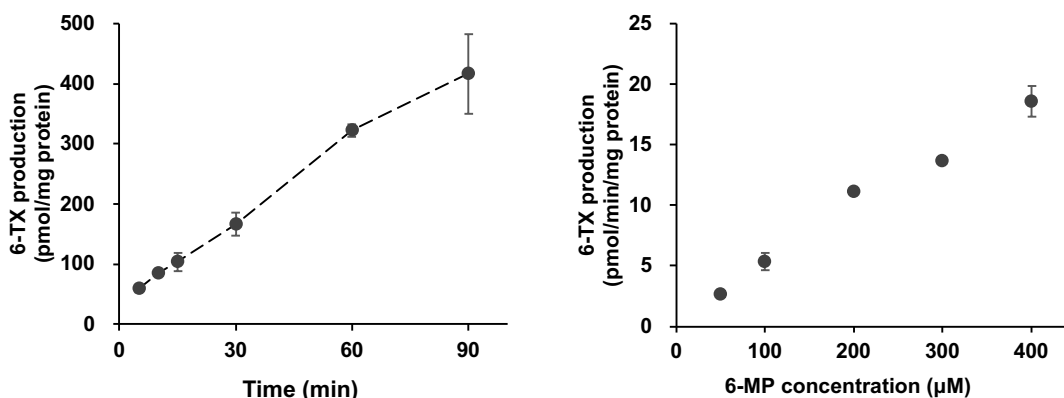


Figure 7 Enzyme kinetic assay for the oxidation of 6-MP to 6-TX. Metabolism of 100 μ M 6-MP was measured for 5–90 min at pH 7.4 using HLC. The velocity of 6-TX production was evaluated under several 6-MP concentration conditions with a reaction time of 15 min. Data represent the means plus or minus *s.e.m.* of three independent experiments.

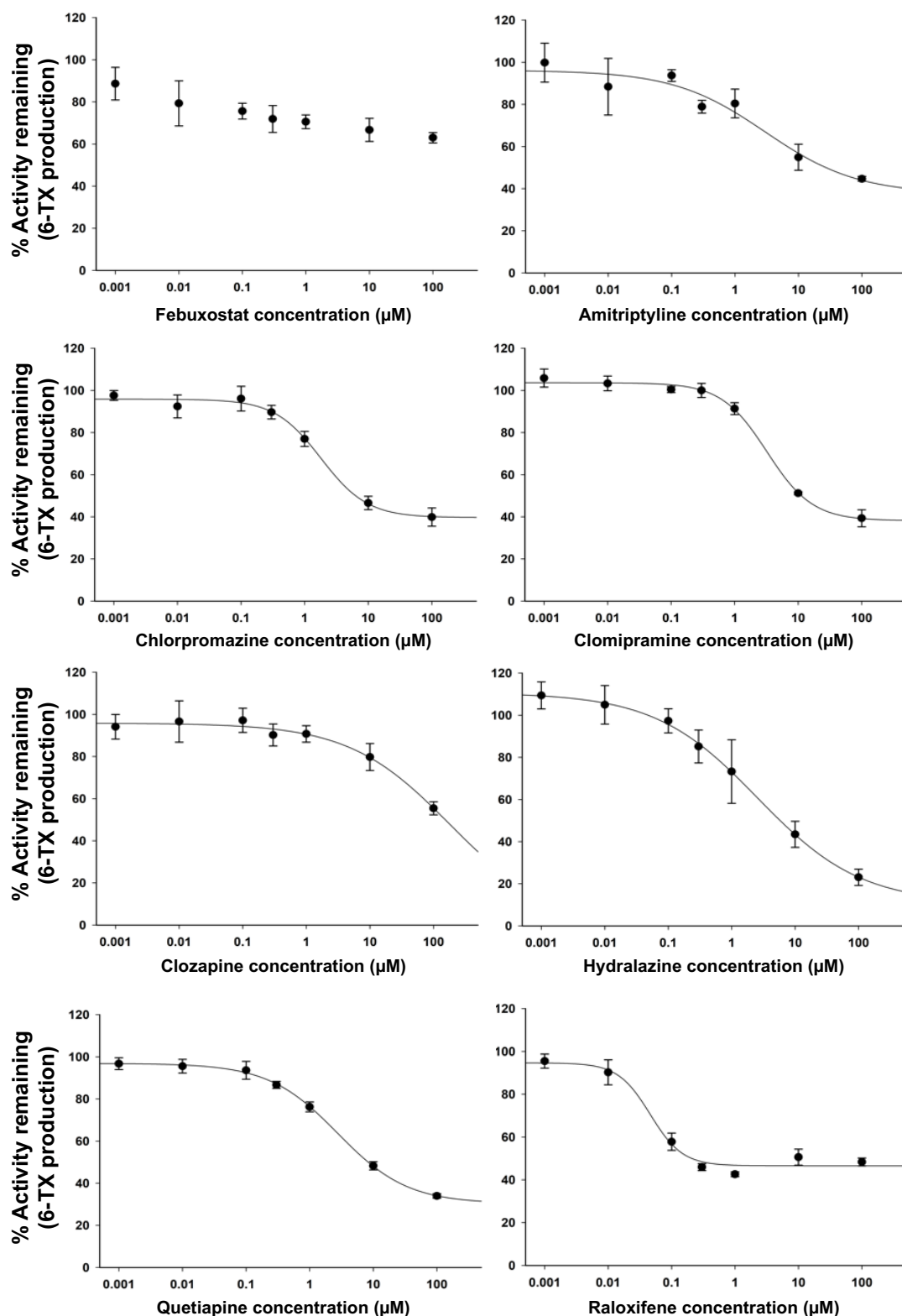


Figure 8 Effects of febuxostat and AOX inhibitors on the oxidation of 6-MP to 6-TX. Inhibitor concentrations were set at 1 nM–100 μM; metabolism of 100 μM 6-MP was measured using HLC at pH 7.4 for 15 min. Data represent the mean plus or minus *s.e.m.* of three independent experiments.

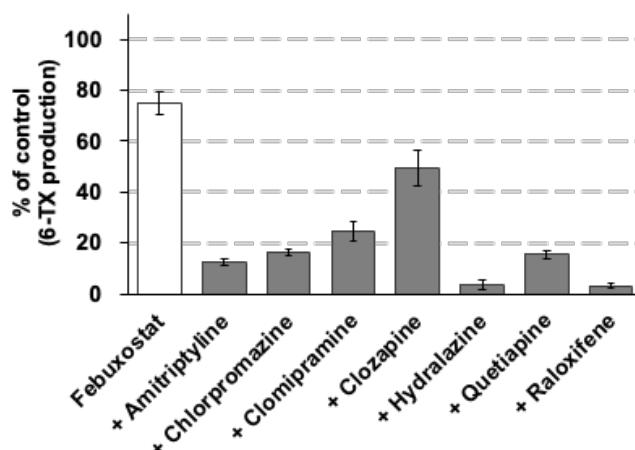


Figure 9 Inhibitory effects of AOX inhibitors in combination with febuxostat. Inhibitor concentrations were set at 5 μM except for raloxifene (100 nM); metabolism of 100 μM 6-MP was measured using HLC at pH 7.4 for 15 min. Data represent the mean plus or minus *s.e.m.* of three independent experiments.

2.3.2 各種 AOX 阻害薬剤の recombinant XO における 6-MP 代謝阻害効果

AOX 阻害薬剤の XO への阻害効果を評価するため, recombinant XO を使用し, 6-MP から 6-TUA への代謝系を用いた. 6-TUA 産生量は 40 min まで直線的に増加し, 基質濃度依存的に増加した (Fig. 10). また 6-MP 20 μM の時点で反応速度が最大となることを確認した. Febuxostat は 0.01 μM で完全に 6-MP 代謝を阻害し, raloxifene は高濃度で XO を阻害した (Fig. 11). しかしながら, その他の AOX 阻害薬剤は XO による 6-TUA の生成量に変化を与えなかったことから, 各化合物は AOX を選択的に阻害することが明らかとなった.

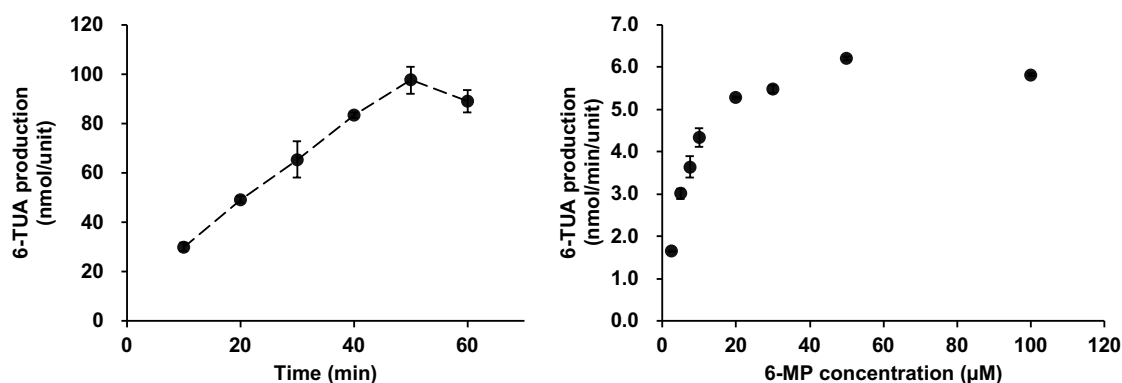


Figure 10 Enzyme kinetic assay for the oxidation of 6-MP to 6-TUA by recombinant XO. Metabolism of 5 μM 6-MP was measured for 10–60 min. The velocity of 6-TUA production was evaluated under several 6-MP concentration conditions (1–100 μM) with a reaction time of 20 min. Data represent the means plus or minus *s.e.m.* of three independent experiments.

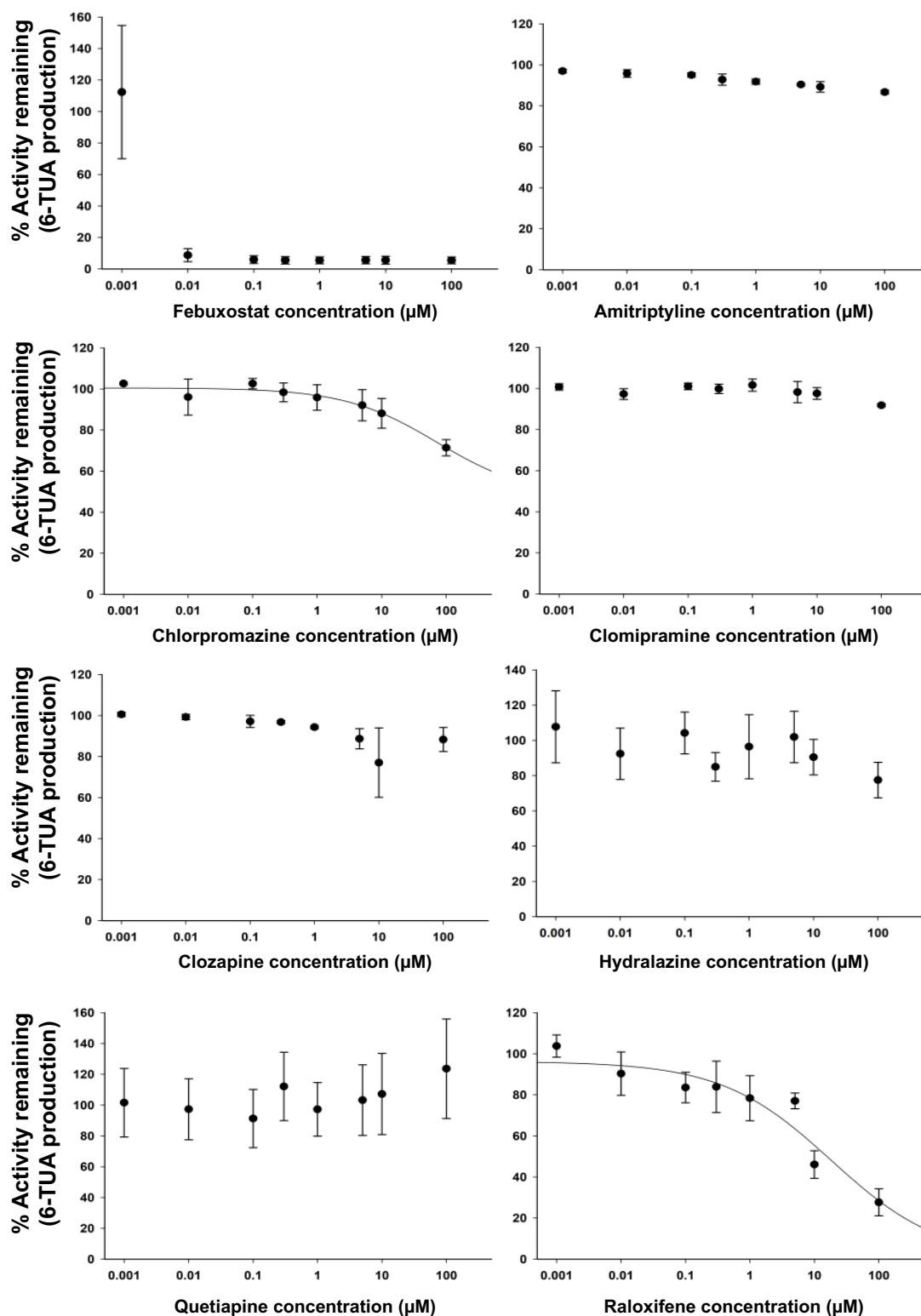


Figure 11 Effects of febuxostat and AOX inhibitors on the oxidation of 6-MP to 6-TUA by recombinant XO. Inhibitor concentrations were set at 1 nM-100 μM; metabolism of 5 μM 6-MP was measured at pH 7.4 for 30 min. Data represent the mean plus or minus *s.e.m.* of three independent experiments.

2.3.3 Hydralazine 投与に伴うラット血中 6-MP 動態の変化

2.3.1–2.3.2 の結果を踏まえ, AOX 選択的に強力な阻害効果を有する hydralazine に着目し, ラット血中 6-MP 動態に及ぼす影響を評価した. 6-MP および hydralazine の投与量は, 既報およびヒトにおける体重あたりの投与量を基に算出したヒト等価用量を参考に設定した^{54–57)}. その結果, hydralazine 併用に伴う 6-MP の血中濃度の増加が確認された (Fig. 12). この相互作用の詳細を評価するために, 薬物動態評価で使用した Jcl:wistar 雄性ラットより得られた extracted RLC ならびに, Xenotech 社の pooled RLC を使用し 6-MP 代謝検討を実施した (Fig. 13). Extracted RLC については AOX の典型基質である phthalazine および阻害剤の raloxifene を用いて AOX の酸化活性を確認している (Fig. 13A). また pooled RLC を 6-MP と混合した際, 反応開始後 5 min 以内に 6-TX は定常濃度に達し, 6-TUA は時間に比例して増加することが明らかとなった (Fig. 13B). そこで各 RLC に対し, febuxostat および hydralazine を単独あるいは併用したところ, febuxostat により 6-TX の生成は阻害される一方で, hydralazine による阻害効果は認められなかった (Figs. 13C, D). この結果より, *in vivo* における 6-MP, hydralazine 間相互作用は AOX とは異なる薬物動態的因子が原因であることが示唆された.

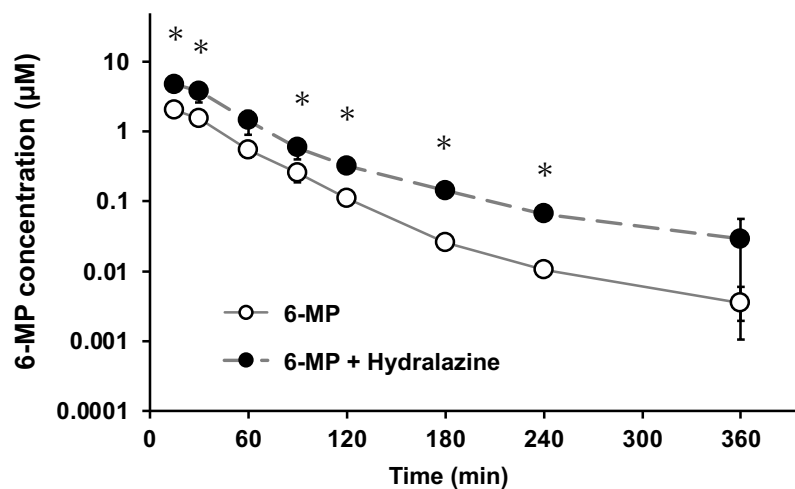


Figure 12 6-MP concentration in rat plasma when combined with hydralazine. 6-MP was administered intraperitoneally and hydralazine was administered intravenously. Blood samples were drawn between 15 min and 6 hr after administration. * $p < 0.05$ compared with 6-MP; unpaired Student's *t* test. Data represent the mean plus or minus *s.d.* of three experiments.

6-MP およびその代謝物は主に尿中に排泄されることから、この相互作用の要因の一つとして、腎排泄に寄与するトランスポーターの寄与が想定される。そこで 6-MP の輸送に関する報告が存在する輸送体の内、近位細尿管に発現する OATs に着目し検討を行った⁵⁸⁾。初めに human OAT1 (SLC22A6) および human OAT3 (SLC22A8) を安定的に発現する HEK293 細胞において、各 OAT の蛍光基質である 6-CF の細胞内取り込み検討を実施した。なお、各 human OAT1/3 安定発現細胞は、それぞれ mock と比較して、6-CF 取り込みにより蛍光が 2 倍、10 倍程度増加することを確認している (data not shown)。6-CF 輸送活性に対する hydralazine および 6-MP の阻害効果を調査した結果、hydralazine は高濃度条件で 6-CF 輸送を阻害し、また 6-MP は 10 μ M 以上でわずかに human OAT1 を介した 6-CF 輸送を阻害した (Fig. 14)。一方で、6-MP は human OAT3 への阻害効果を示さなかった。

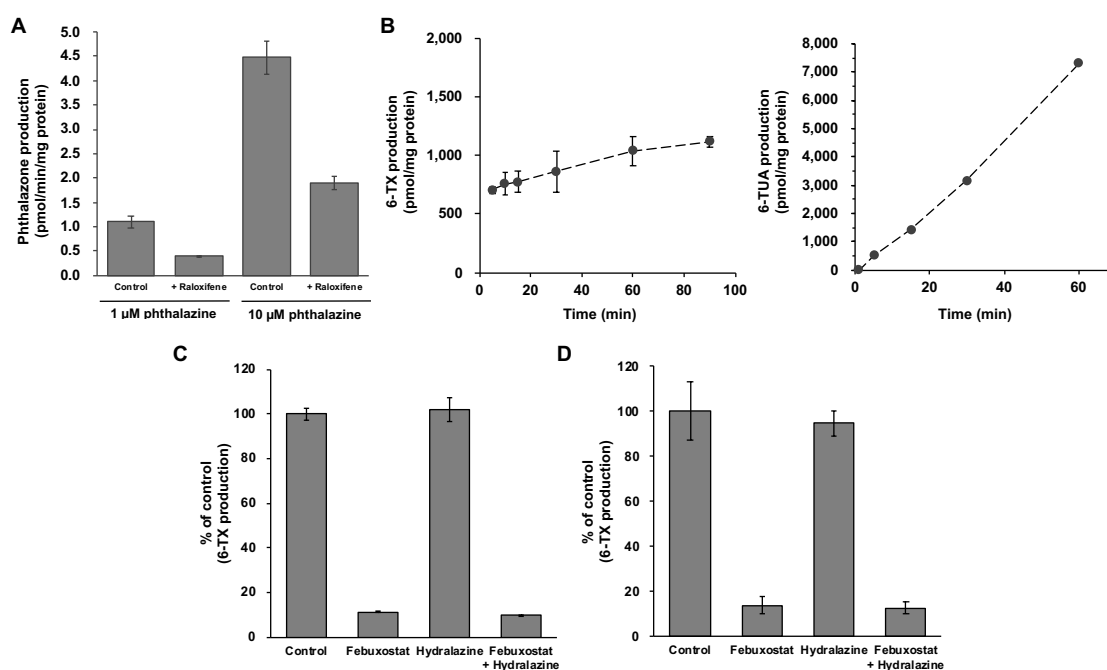


Figure 13 AOX and XO activity of RLC. (A) Phthalazine oxidation by AOX using extracted RLC. Cytosol were used at concentration of 0.1 mg/mL and incubated for 10 min with or without 1 μ M raloxifene. (B) 6-MP metabolism to 6-TX and 6-TUA in the pooled RLC at each reaction time. Inhibitory effect of febuxostat and hydralazine on 6-TX production using (C) extracted RLC and (D) pooled RLC. Metabolism of 50 μ M 6-MP was measured at pH 7.4 for 3 min. Data represent the mean plus or minus *s.e.m.* of three independent experiments.

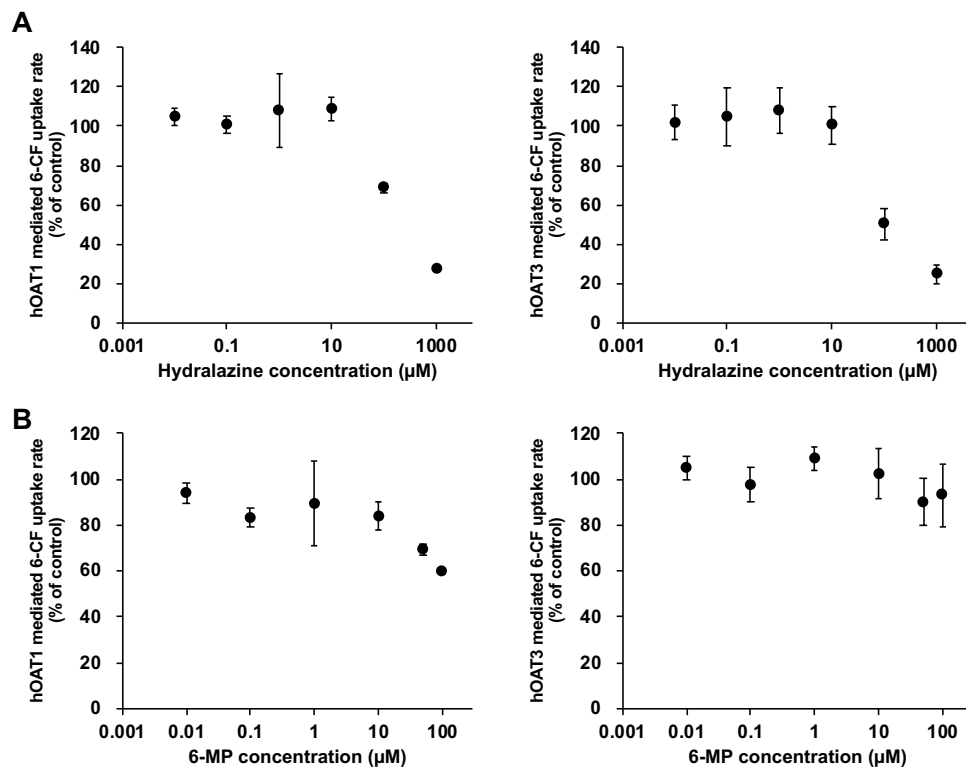


Figure 14 Inhibition of (A) hydralazine and (B) 6-MP for 6-CF uptake rate mediated by human OAT1/3. Cells were incubated with 0.5 μM 6-CF at 37°C for 3 min. Data were calculated by subtracting the uptake rate in mock cells, and represent the mean plus or minus *s.e.m.* of three independent experiments.

2.4 考察

本章では前章で調査した AZA による有害事象における AOX の関連を評価するため、肝由来画分、動物モデルによる 6-MP 動態に関して検討を行った。6-MP を基質とした際の 6-TX 代謝は、時間および濃度に相関して比例的に増加することが確認されたことから、Choughule らの報告¹⁵⁾と同様の反応条件において AOX 阻害薬剤の影響を評価した。その結果、全ての AOX 阻害薬剤において、阻害剤濃度依存的な 6-TX の減少が認められた。AOX への阻害強度および阻害様式は、対象とした基質化合物によって異なることが知られている⁵⁹⁾。本検討における 6-MP 酸化に対する阻害強度は、既報の phthalazine 代謝に対する阻害効果と相関する結果となった⁴¹⁾。また各 AOX 阻害薬の高濃度条件での 6-TX 生成速度は、阻害剤非添加時の 30–40%であることから、今回の反応条件における AOX の寄与率は、6-TX 生成経路の 6–7 割程度であると推定された (Fig. 8)。XO 阻害薬剤として用いた febuxostat は、濃度依存的に 10–30%の阻害効果を示しており、febuxostat と raloxifene あるいは hydralazine の併用により 6-TX の産生が完全に阻害されたことから、6-TX への変換における AOX の寄与の大きさが示唆された。また raloxifene を除いたその他の AOX 阻害薬剤は XO の機能を阻害しなかったことから、AOX による 6-MP 代謝の寄与を選択的に評価出来ているものと考えられる (Fig. 11)。

Clozapine を除いて、その他の AOX 阻害薬剤は 5–10 μM 程度で AOX による 6-MP 代謝を大幅に阻害した (Fig. 8)。第 1 章 1.2.2, Table 1 に記載した通り、各薬剤の最高血中濃度は 0.1–0.5 μM 程度である。一方で、セロクエル® のインタビューフォーム中において、ラットに [^{14}C] quetiapine 25 mg/kg 投与後の最高組織内放射能濃度を示した時点では、血漿中放射能濃度の約 20 倍高い放射活性が肝臓にて検出されている⁶⁰⁾。またコントミン® のインタビューフォームには、イヌに 20 mg/kg の chlorpromazine 投与した際に、肝臓では血漿中の約 14.6 倍の濃度で検出されることが記載されている。また chlorpromazine は体内に長時間残留し、投与中止 3 ヶ月後にも代謝物が排泄される⁶¹⁾。以上のことから、肝細胞中には血漿中より高濃度あるいは長期に薬剤が存在し、薬物間相互作用の要因となっている可能性が高いことが推察される。

チオプリン製剤の添付文書上には、XO 阻害薬剤である febuxostat や topiroxostat, allopurinol は併用禁忌あるいは併用注意と明記されている。本検討の結果を踏まえると、6-MP 動態には XO より AOX の寄与が大きいと考察されるが、AOX 阻害薬剤併用に伴うチオプリン誘発性有害事象の増加に関する臨床的な報告がないことから、*in vitro* の検討と実際のヒト肝臓内における代謝反応には差異がある可能性が考えられる。

XO には同一の遺伝子産物でありながら形質の異なる xanthine dehydrogenase (XDH) が存在する。XDH 中の Cys535 と Cys992 間のジスルフィド結合により、可逆的に XO へと遷移することが知られている。XDH は NAD^+ を補酵素とするのに対し、XO では NAD^+ 結合ポケットが消失する代わりに、疎水性の高い溶媒ゲートを形成することで分子状

酸素を電子受容体として利用する⁶²⁾。このシステイン残基は AOX では保存されていないことから、この形質変換は XO および XDH 特異的な性質であることが知られている。本実験条件では NAD⁺等の補酵素を添加していないため、6-MP の代謝における XDH の寄与は考慮されていない。XDH は上記の遷移の他に、プロテアーゼにより不可逆的に XO に変換されることも知られており、ラット肝臓酵素の精製中に生じるリソソームの破壊によっても XO 型に遷移する⁶³⁾。今回使用している HLC 中では、XO 型分率が高い状態であることを仮定して検討を行ったが、実際のヒト肝臓中では XDH が共に 6-MP 代謝に寄与している可能性がある。また乳汁中では基本的に XO 型で存在することから、今回のウシ乳汁より精製された recombinant XO を用いた検討においても、XDH に対する各種 AOX 阻害薬剤の影響は評価出来ていないことを留意する必要がある⁶⁴⁾。

また既報では、HLC 中の 6-MP から 6-TX への代謝において、基質濃度に依存して反応速度は二相性を示していることから、基質に対して親和性の異なる 2 種類の酵素が機能していることが示唆されている ($V_{\max 1}$: 0.08 nmol/min/mg, K_{m1} : 88.2 μ M; $V_{\max 2}$: 0.2 nmol/min/mg, K_{m2} : 500 μ M)¹⁵⁾。さらに、同報告にて精製ヒト AOX による 6-MP 代謝における K_m が上記の K_{m2} と近似していることが示されている。したがって AOX は XO と比較して、6-MP 酸化反応において低親和性かつ高反応速度的な性質を有すると推察される。本章における実験条件では、産生される 6-TX を UPLC-MS/MS にて定量しており、その定量下限を考慮して、基質である 6-MP 濃度を 100 μ M と設定している。過去に 100 mg ³⁵S-AZA 服用 2 時間後に最大血漿中濃度 7.2–13.2 μ M 程度(最大放射活性 2 μ g/mL)となることが報告されている⁶⁵⁾。6-MP の組織移行に関する知見はなく肝臓中における濃度は不明であるが、6-MP の投与量に応じて XO と AOX の寄与率が異なると考えられる。したがって、今回の反応条件では、臨床治療濃度における生体内での 6-MP 代謝と比較して、AOX の寄与の高いモデルである可能性がある。

チオプリン製剤による治療中において、免疫抑制効果が不十分かつ投与量増加に伴い肝障害が現れる場合に、allopurinol を併用する場合がある⁴⁹⁾。また XO は医薬品以外にも、食餌由来のフェノール酸やポリフェノール類によって阻害されることが知られている^{66–68)}。上記のような化合物が共存する XO の機能抑制下では、AOX が代償的に 6-MP 代謝を担っている可能性が考えられる。加えて、人種毎に差はあるが、肝組織におけるキサンチン代謝検討およびカフェインを用いた代謝産物量より、XO 活性が低下していると推定される患者が 1–3 割程度存在することが報告されている^{69, 70)}。さらに、いくつかの SNPs は XO の活性低下の要因となっており、一部の SNPs においては先天性 XO 欠損症であるキサンチン尿症との関連を示唆する報告も存在する⁷¹⁾。XO 機能が抑制あるいは低下している患者において、AOX 阻害薬剤併用による 6-MP 血中動態および副作用発現への影響は不明である。したがって、ヒト肝臓組織内での AOX 機能を評価するためにも、患者背景を限定したさらなる研究が必要である。

本章では、ラットモデルによる 6-MP 血中動態における AOX 機能の解明を試みたが、HLC と RLC における 6-MP 代謝の挙動が異なることから、ヒト体内における 6-MP 代謝プロファイルを再現できないことが示された (Fig. 13). AOX には AOX1-4 の 4 種類のアイソフォームが存在しており、ヒトでは AOX1 以外のアイソザイムは pseudogene (AOX2, AOX3) あるいはコードする遺伝子配列は存在していない (AOX4). 一方で mouse や rat は 4 種全ての AOX が存在し、肝臓では主に Aox1, Aox3 が機能している⁷²⁾. human AOX1 と最も類似性の高いアイソフォームは、それぞれ rat Aox1 (identity: 83.12%), mouse Aox1 (identity: 83.10%) であるが、mouse では肝臓中の Aox3 (identity: 62.36%) の存在量が多いことが示唆されている. 加えて、Basit らは定量的プロテオミクス解析により、human と比較して rat, mouse における Aox1 タンパク質量が僅少であることを明らかにしており、AOX 発現量の種差を示唆している⁷³⁾. また、動物種毎の肝サイトゾル画分における AOX 基質薬 favipiravir の代謝活性は cynomolgus >> human > mouse > rat の順であり、同じく AOX の基質薬剤である BIBX1382 の酸化反応速度は cynomolgus ≈ minipig > human > guinea pig >> rabbit ≈ mouse であることが知られている^{11, 74)}. したがって、霊長類と比較して齧歯類では AOX の寄与が低く見積もられる可能性がある. 以上より、AOX 活性の種差は、アイソフォームや発現量、基質結合ポケットを含めた立体構造の違いに起因していると推察される. また 6-MP の他にも、metabotropic glutamate receptor 5 受容体拮抗薬として開発された VU0409106 ならびに auglurant (VU0424238) は、AOX と XO 双方より酸化を受けることが知られている^{75, 76)}. Auglurant の構造中の含窒素複素環は、6-MP と同様に M1 (6-oxopyrimidine) を経て M2 (2,6-dioxypyrimidine) へと二段階で酸化される. この M1 から M2 の代謝において、齧歯類では Xo が、guinea pig および rhesus や cynomolgus では Aox が機能しており、ヒトではそもそも代謝活性が低く M2 が検出されない. この結果からも、AOX と XO の活性や寄与率は動物種によって大きく異なることが確認できる.

Itoh らは、基質として RS-8359 を用いた際の AOX 活性において、ラットの系統間にも差があることを報告している (Jcl:Wistar >> Slc:SD > Crl:SD > Slc:Wistar)⁷⁷⁾. 加えて、Tayama らは、allopurinol 自体が XO と AOX によって oxypurinol へと代謝されることに着目し、Slc:SD および Crl:SD における allopurinol 動態を評価している⁷⁸⁾. その結果、febuxostat を併用下では、AOX 高活性の Jcl:SD 群において、Crl:SD 群より高い oxypurinol/allopurinol 比を示している. これは XO を完全に阻害することで、allopurinol の責任代謝酵素が AOX のみになったために生じた差違であると考えられる. 既報に基づくと、今回使用した Jcl:Wistar 種は比較的 AOX 活性が高く⁷⁷⁾、また本検討においても、RLC 中の AOX が phthalazine の酸化に寄与していることを確認している. 以上より、代謝経路に AOX 以外の薬剤が関連する化合物に関しては、AOX 活性の高い系統のラットであっても、ヒトの体内動態を再現することは困難であると考えられる. 一方、Takaoka らは cDNA-uPA/SCID mice に脾臓経由でヒト肝細胞を移植したヒト肝臓モデルマウス

(PXB mice) を使用して, AOX 基質化合物である O⁶-Benzylguanine と hydralazine の相互作用が起き得ることを明らかにしている⁷⁹⁾. また Uehara らは, NOG-TKm30 mice から作製されたヒト肝臓モデルマウスで BIBX1382 動態を評価している⁷⁴⁾. したがって, 実験動物の肝臓の一部をヒト由来に置換したキメラマウスは, AOX 基質薬物の血中動態を予測する上で重要な実験モデルとなる可能性がある.

本検討において, hydralazine 併用によりラット血中 6-MP 濃度の増加が認められた一方で, ラット肝臓および RLC では, 6-MP 代謝に AOX が寄与していないことが明らかとなった (Figs. 12, 13). Hydralazine は XO 代謝阻害効果を示さないことから, この血中プロファイルの変化は, 6-MP 酸化経路以外の代謝酵素あるいは輸送担体を介した相互作用が原因と考えられる. Organic anion transporter 3 (OAT3) は腎近位尿管および血液脳関門に発現し, 薬物の排泄に寄与する SLC トランスポーターの一種である. Kobayashi らは, mouse Oat3 発現 *Xenopus laevis* oocytes を使用し, [¹⁴C] 6-MP が mouse Oat3 に輸送されることを報告しており (K_m : $4.01 \pm 0.7 \mu M$), また allopurinol が mouse Oat3 を介した 6-MP 輸送を阻害することを明らかにしている⁵⁸⁾. そこでヒト腎臓に発現する OAT1 および OAT3 について, 6-MP と hydralazine 間相互作用の可能性を検討した. その結果, hydralazine は高濃度の場合のみ human OAT1/3 基質である 6-CF 輸送を阻害した一方で, 6-MP は 6-CF 輸送をほとんど阻害しなかった (Fig. 14). El-Sheikh らは human OAT1/3 の基質薬剤として [³H]-MTX を使用した際にも, 10 μM 6-MP は阻害効果を示さないことを報告しており⁸⁰⁾, この知見は本検討の結果と一致すると考えられる. したがって, 直接的に 6-MP と hydralazine が OAT に対し競合していないと推察される.

その他にも, 6-MP の副作用や血中動態との関連が示唆されるトランスポーターとして multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4), organic anion transporting polypeptide1B1 (OATP1B1) が知られている. これまでに, MRP4-KO マウスにおける 6-MP の動態変化や⁸¹⁾, 遺伝子多型 (rs3765534) と 6-MP 治療効果の関連が報告されている⁸²⁾. これらの機序として, 主に血球細胞膜上に発現する MRP4 が 6-MP の血液毒性の減弱に寄与していると考えられている. しかしながら, MRP4 は肝血管側膜や腎刷子縁膜など広範囲に存在していることから, 本検討における 6-MP 血中濃度推移の変化にも関連している可能性がある. また基質化合物の肝細胞への取り込みを担う OATP1B1 に関して, rs4149056 や, それに連鎖する rs11045879 等の遺伝子多型と, チオプリン製剤の治療効果低下との関連性を示唆する報告も存在する⁸³⁾. 現状, 6-MP の蓄積や排泄において, 上記のトランスポーターの直接的な機能を評価した知見は限られている. また本検討では, 腸管からの吸収過程における, 6-MP および hydralazine 間相互作用の可能性を排除するため, 腹腔あるいは静脈内より薬剤を投与している. しかしながらチオプリン製剤は基本的に経口投与であり, 本検討では初回通過効果における相互作用を評価出来ていない. 6-MP の体内動態および相互作用を解明するためにも, 各々の発現系や阻害剤を使用した, より詳細な検討が必要である.

また、6-MP は生体内で速やかに 6-TUA へと代謝され、そのほとんどが尿中に排泄される。加えて、6-TUA 濃度の増加に伴い、6-MP の酸化が抑制されることが知られている。したがって、6-TUA の排泄遷延が、間接的に 6-MP の血中濃度増加に起因している可能性について考慮する必要がある。

2.5 小括

各種 AOX 阻害薬剤によって、6-MP から 6-TX への代謝が阻害されることを確認した。また、その阻害効果は febuxostat 共存下でも得られたことから、各種 AOX 阻害薬剤は XO ではなく AOX 選択的な 6-MP 代謝の阻害によるものであることが明らかとなった。しかしながら、ラットとヒトの種差により、*in vivo* における生体内での相互作用は困難であった。実臨床における AOX の重要性を評価する上でも、ヒトを対象とした臨床研究が重要である。しかしながら、代謝経路に AOX 以外の代謝酵素が関わる場合、各代謝酵素の遺伝子多型による活性の低下や、阻害薬剤の併用条件を考慮した上で、AOX 機能を評価する必要があると考えられる。

第3章 SNPs による AOX1 活性の差異ならびにその機序の解明

3.1 緒言

ヒト肝臓サンプルには AOX1 発現量と酵素活性に大きな個体間差が観察される。Amano らは、28 人のドナーより提供された肝より抽出した HLC を用いた検討により、dantrolene 還元活性は 37 倍、phthalazine 酸化活性は 61 倍の差異があることを明らかにしている¹⁶⁾。またこれらの活性は、western blotting (WB) により評価された AOX1 タンパク質発現量と相関しているが、一部のドナーでは発現量に対して高活性あるいは低活性を示している。したがって、AOX のタンパク質構造や複合体形成の差違が、AOX 酵素活性における個体間差に関連することが示唆される。

遺伝子多型は代謝活性と薬物動態の個人差を生み出す要因の一つであり、いくつかの SNPs が AOX 活性に影響を与えることが報告されている。AOX1 遺伝子のコーディング領域における遺伝子変異である N1135S (rs55754655; c.3404A>G) と H1297R (rs3731722; c.3890A>G) は、minor allele frequency (MAF) が比較的高い nsSNPs であり、臨床研究でも治療効果や動態との関連性が示唆されている。Carroll らは、rs3731722 が高尿酸血症治療における allopurinol の投与量 (300 mg/day) と相関することを報告している²⁶⁾。また前述した通り、rs55754655 は赤血球中 6-TGN 濃度および TPMT 活性に依存せずに AZA の治療抵抗性と関連することや、AZA 服用量の増量と関連する^{39, 40)}。一方で、AOX 基質薬剤である XK469 のクリアランスと rs55754655 には相関がないことが報告されている²⁷⁾。以上より、AOX1-SNPs の影響は服用薬剤や患者背景によって異なっており、一致した見解は得られていない。

Hartmann らはイタリア人集団 180 人の遺伝子配列を調査し、AOX1-nsSNPs の頻度ならびに活性調査を行った。その結果、N1135S (MAF/0.029) および H1297R (MAF/0.053) は phenanthridine の酸化におけるターンオーバー数 k_{cat} を増加させることが明らかとなった⁸⁴⁾。Hutzler らは、凍結保存された単一ドナーのヒト肝細胞を使用することで、O⁶-Benzylguanine 酸化活性における 17 倍の個体間差を検出した⁴⁾。加えて、AOX1 の N1135S, H1297R 変異を有する肝細胞では、高い触媒活性の傾向を示すことが確認された。しかしながら、これらの研究では AOX1 の活性低下を引き起こす SNPs は見つかっておらず、また HLC ドナーの人種が単一であることから、その他のモンゴロイドやネグロイド等の種々の人種背景における AOX の個体間差の要因は未だ不明な点が多い。

以上の既報を踏まえ、本章では、実臨床における AOX1-SNPs の影響の評価、ならびに、AOX 基質化合物の代謝活性に影響を与える新規 SNPs の同定を目的として、公開ゲノムデータベースを用いた AOX1-SNPs の探索、および活性評価を行った。

3.2 実験材料および方法

3.2.1 試薬

Phthalazine は Sigma-Aldrich Chemical Corp. (St. Louis, MO, USA) から購入した. Phthalazone は Tokyo Chemical Industry Corp. (Tokyo, Japan) から購入した. Carbamazepine は FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp. (Osaka, Japan) から購入した. その他の試薬は特に断らない限り特級もしくは生化学用, 分子生物学用のものを用いた.

3.2.2 nsSNP の探索

本研究では, 代謝活性を評価する *AOX1* 遺伝子の nsSNPs を選択する上で, SNPs 情報を含むゲノムデータベースである 1000 Genomes Project (1KGP) および genome aggregation databases (gnomAD) を参照した^{85, 86)}. またその際の基準として, 上記のデータベースに集録されている SNPs のうち, 1) コーディング領域に位置する SNPs であり, 2) いずれかの人種集団において MAF が 1% 以上であることを基準とした.

3.2.3 nsSNP の変異有害性の予測

各 SNPs に伴う AOX1 機能の変動への影響は, PolyPhen2⁸⁷⁾, SIFT4G⁸⁸⁾, PROVEAN⁸⁹⁾, REVEL⁹⁰⁾ の 4 種のツールを用いて予測した.

3.2.4 変異体 AOX1 プラスミドの作製

Wild type (WT) human AOX1 の配列は Refseq 内の Accession 番号 “NM_001159” を参照し, Eurofins Genomics (Tokyo, Japan) に合成を委託した. 合成された遺伝子は NotI と XhoI で処理後, pcDNA3.1 (+) vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) に組み込み, WT AOX1 プラスミドベクターを作成した. 次に, この WT AOX1 プラスミドを鋳型とし, 変異導入プライマー (Table 4) を用い, QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) により各変異体に相当する AOX 配列を増幅させた. 得られたプラスミドを再度 NotI と XhoI サイトで pcDNA3.1 (+) vector に組み込むことで各 Mut AOX1 プラスミドベクターを作製した. プラスミド中の AOX コーディング領域はシーケンスプライマーを用いてシーケンス解析を行い確認した (Fig. 15).

Table 4 Primer sequences for mutagenesis.

rsIDs	Protein Consequence	Transcript Consequence	Sequence (5'-3')	
rs58185012	Q314R	941A>G	Forward	CTAGCCCGGGTGAAGGACATTTTGGCTGATG
			Reverse	CTTCACCCGGGCTAGGCTGAGACCAGC
rs143935618	I598N	1793T>A	Forward	GAGGCCAACTACTGTGATGACATGCCTCTGG
			Reverse	ACAGTAGTTGGCCTCCCCCGTGGCATG
rs35217482	T755I	2264C>T	Forward	ATGGAAATCCAAAGCATGCTTGTCTGTTCCCAAGGG
			Reverse	GCTTTGGATTTCATATAAAAAATGTTCTTGACCTCCCATATG
rs139092129	A1083G	3248C>G	Forward	CCTAATGGAAATATCTCTGGAGGTTCTGTGGTGGC
			Reverse	GATATTTCCATTAGGGACAGTTTCTGTGCTTGTTCACG
rs55754655	N1135S	3404A>G	Forward	AGCATTAGCCTTTCAGCTGTTGGATACTTCAGAGG
			Reverse	GCTGAAAGGCTAATGCTTTCATCAAAAGCAGTCTGTG
rs3731722	H1297R	3890A>G	Forward	GAGAGAGGCCTGCGTGGACCCCTTGAC
			Reverse	GTCAAGGGTCCACGCAGGCCTCTCTC

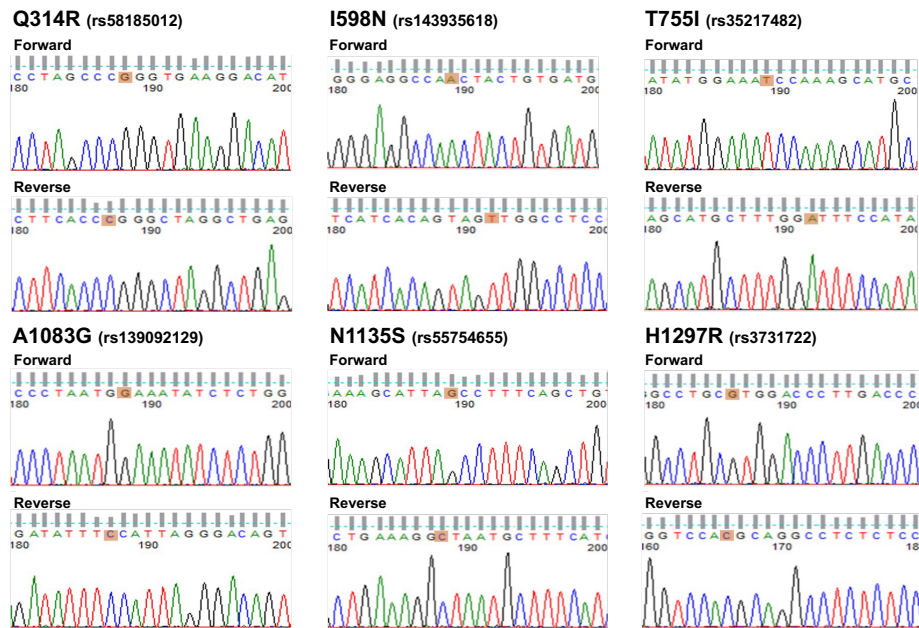


Figure 15 Electropherograms of the AOX1 SNPs: Q314R, I598N, T755I, A1083G, N1135S, and H1297R. The locations of SNPs are highlighted in red color.

3.2.5 大腸菌の培養とプラスミド抽出

WT および Mut AOX プラスミドの作製に使用した大腸菌 DH5 α 株は, LB 培地を用い 37°C で振盪培養した. また, 選択圧として ampicillin を終濃度 100 μ g/mL で使用した. 大腸菌からのプラスミド抽出には FastGene Plasmid Mini Kit (Nippongenetics, Tokyo, Japan) を用い, 付属のプロトコルにしたがって行った.

3.2.6 使用細胞および遺伝子導入

各 SNPs による機能変化および AOX1 の発現変動を評価する上で, 本検討では 10 % FBS 添加ダルベッコ改変イーグル培地で培養した HEK293T 細胞を用いた. 培養条件は 2.2.6 と同様とした. 細胞を播種した 24 時間後, 各種ベクターを Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を用いて導入することで, WT および Mut AOX1 を発現させた. トランスフェクションの 48 時間後に, 細胞を 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 中に分散させ超音波処理により破碎した. 得られた細胞懸濁液を遠心分離 (9,000 g, 20 min, 4°C) することで得られた S9 画分を用い, 後の WB および代謝アッセイに使用した.

3.2.7 SDS, Native-PAGE/WB

総タンパク質発現量は SDS-PAGE, 単量体および二量体の検出は Native-PAGE により分離後, WB にて検出した. S9 画分に等量の 2 $\times$ SDS sample buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, and 0.004% bromophenol blue) あるいは 2 $\times$ sample buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, and 0.004% bromophenol blue) を添加した後, 10% ポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE) あるいは 8–25% グラジエントポリアクリルアミドゲル (Native-PAGE) にて電気泳動を行った. Native-PAGE におけるゲルおよび泳動バッファーには SDS を添加せず使用した. ゲルを PVDF 用メンブレン膜に転写後 (15 V for 90 min in transfer buffer: 48 mM Tris, 39 mM glycine, 0.13 mM SDS, and 20% MeOH), 1% スキムミルクでブロッキングし, その後に 1,000 倍希釈した rabbit AOX1-specific primary antibody (19495-1-AP; Proteintech Group Inc., Rosemont, IL) あるいは 4,000 倍希釈した rabbit monoclonal anti-actin antibody (ab179467; abcam, Cambridge, UK) サンプル中で一晩反応させた. 翌日 0.05% Tween20/PBS で三度洗浄後, 4,000 倍希釈した mouse anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) サンプル中で 1 時間反応させた. メンブレンを更に三度洗浄後, ECL Prime Western Blotting System および ImageQuant™ LAS 4000 mini (Cytiva, Tokyo, Japan) にてバンドを検出した. 画像解析は ImageJ software を用いてバンドの定量を行った.

3.2.8 Phthalazine 酸化アッセイ

HEK293T 細胞より抽出した S9 画分 (1–1.4 mg protein/mL) を 3 分間プレインキュベーションした後, AOX1 の典型基質である phthalazine を添加することで酸化反応を評価した. 反応液中の DMSO の最終濃度は 0.1% 以下とし, 最終反応液量が 50 μ L となるよう調製した. 酸化反応開始 10 分後, 内部標準 (200 nM carbamazepine) を含む methanol を 150 μ L 添加し反応を停止させた. サンプルを遠心分離した後 (16,000 g, 15 min, 4°C), 上清 10 μ L を UPLC-MS/MS にインジェクションし, 2.2.8 に記載の条件で phthalazone の生成量を定量した.

3.2.9 UPLC-MS/MS による phthalazone の定量

UPLC/MS/MS の条件は既報を参考にした⁴¹⁾. Phthalazine より酸化され生成された phthalazone の定量には Waters ACQUITY UPLC H-Class System および Xevo TQ-S mass spectrometer (Waters Corporation, Milford, MA, USA) を用いた. 注入されたサンプルの分離には Waters ACQUITY UPLC BEH C18 column (1.7 mm, 2.1 $\times$ 50 mm) を使用し, カラム温度を 40°C, 流速を 0.4 mL/min とした. 移動相には 0.1% formic acid in water (mobile phase A) および methanol (mobile phase B) を使用し, 次のグラジエント条件で送液した: 100%–30% A for 2.5 min, 30% A from 2.5 to 4 min, and 30%–100% A from 4 to 4.1 min, 100% A until 6 min. 液体クロマトグラフィーより分離された化合物は, ESI⁺にてイオン化した後 Xevo TQ-S mass spectrometer にて検出した (m/z : 147 > 118 for phthalazone; 237 > 194 for carbamazepine).

3.2.10 数値解析

速度論解析には SigmaPlot 14.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA) を用いた. K_m および V_{max} は, 測定データを Michaelis-Menten kinetic model に非線形カーブフィッティングさせることによって算出した. 統計解析は R ver. 4.4 および multcomp パッケージを使用し, unpaired Student's t test による 2 群間の比較, Dunnett's test あるいは Tukey's post hoc test による多群間における有意差の検定を行った. いずれの場合も $p < 0.05$ を統計学的に有意であると判定した.

3.2.11 AOX1 タンパク質の立体構造表示および multiple alignment

AOX1 のタンパク質構造は Protein Data Bank の 4UHW を参照した⁹¹⁾. 立体構造の表示および SNPs によるアミノ酸の置換は PyMOL ver. 2.5.5 (Schrödinger, New York, NY, USA) 上で行った. 低分子化合物および多型の見られるアミノ酸は stick 表示, その他タンパク質配列などの高分子は cartoon および surface 表示とした.

Multiple alignment には Molecular Evolutionary Genetics Analysis ver.11 を使用した⁹²⁾. human AOX1 との比較対象として alignment に使用したタンパク質配列は, 次を示す各種哺乳類の AOX および XDH のコーディング領域を参照した: Homo sapiens AOX1, NP_001150; Mus musculus Aox1, NP_033806; Mus musculus Aox2, NP_001008419; Mus musculus Aox3, NP_076106; Mus musculus Aox4, NP_076120; Oryctolagus cuniculus Aox1, NP_001075459; Macaca mulatta Aox1, NP_001268238; and Homo sapiens XDH, NP_000370.

3.3 実験結果

3.3.1 各 AOX1-SNPs におけるアレル頻度および各変異体の影響予測

human AOX1 の主鎖は 1338 個のアミノ酸より形成されており、その構造的特徴および機能から、1) [2Fe-2S]ドメイン I (20kDa), 2) FAD ドメイン II (40kDa), 3) Moco を内包する C 末端ドメイン III (90 kDa) の 3 種類のドメインに分けられる⁹³⁾。本研究で評価する SNPs として、ゲノムデータベースである 1KGP および gnomAD より、各人種集団の MAF に基づき、以下に記載する 6 種の nsSNPs を選出した (Table 5): Q314R (rs58185012; c.941A>G), I598N (rs143935618; c.1793T>A), T755I (rs35217482; c.2264C>T), A1083G (rs139092129; c.3248C>G), N1135S (rs55754655; c.3404A>G), H1297R (rs37317222; c.3890A>G)。また各 SNPs は、ドメイン II における変異である Q314R を除き、他の 5 種の SNPs は全てドメイン III に位置していた。また N1135S および H1297R は、ほとんどの人種集団において MAF が 1%以上であったのに対し、I598N は American および East Asian, Q314R ならびに A1083G は African のみ、そして T755I は East Asian のみに特異的に見られる SNPs であることが明らかとなった。

Table 5 Minor allele frequency of nonsynonymous mutation in the AOX1 gene. Data were obtained from the 1KGP and gnomAD databases. The sample size of each race is denoted in parentheses.

1KGP		Populations (n)				
NCBI SNP ID	Amino Acid Change	African (1,322)	American (694)	Europe (1,006)	East Asian (1,008)	South Asian (978)
rs58185012	Q314R	0.027	0.001	0	0	0
rs143935618	I598N	0.002	0.042	0	0.012	0
rs35217482	T755I	0	0	0	0.010	0
rs139092129	A1083G	0.011	0.003	0	0	0
rs55754655	N1135S	0.268	0.072	0.121	0.003	0.021
rs3731722	H1297R	0.039	0.157	0.071	0.094	0.098

gnomAD		Populations (n)								
NCBI SNP ID	Amino Acid Change	African American (8,128)	Latino/Admixed American (17,296)	Ashkenazi Jewish (5,040)	European (Finnish) (19,824)	European (non-Finnish) (56,885)	East Asian (9,197)	South Asian (15,308)	Other (3,070)	Overall (125,748)
rs58185012	Q314R	0.023	0.001	0	0	0	0	0	0	0.002
rs143935618	I598N	0	0.065	0	0	0	0.012	0	0.007	0.010
rs35217482	T755I	0	0	0	0	0	0.012	0	0	0.001
rs139092129	A1083G	0.009	0.001	0	0	0	0	0	0	0.001
rs55754655	N1135S	0.255	0.070	0.093	0.092	0.138	0.003	0.043	0.129	0.109
rs3731722	H1297R	0.041	0.131	0.036	0.110	0.065	0.080	0.091	0.065	0.079

上記の 6 種類の SNPs について、その酸化能を評価するに先立ち、2.2.3 に記載した各種予測ツールにより各変異の機能的影響を調査した (Table 6). 今回用いた web ツールの内, PolyPhen2, SIFT4G, PROVEAN にはカットオフ値が定められており、それぞれのスコアが 0.9 以上, 0.05 未満, -2.5 未満の際に、機能的に影響がある (Damaging あるいは Deleterious) と定義されている。今回調査した SNPs のうち T755I はすべてのツールにおいて影響を及ぼすと予測され、また 0-1 の値を取る REVEL のスコアは最も高い値を示した。

Table 6 Prediction of the changes of stability caused by each of the nsSNPs.

Amino Acid Change	PolyPhen2 Score	PolyPhen2 Prediction	SIFT 4G Score	SIFT 4G Prediction	PROVEAN Score	PROVEAN Prediction	REVEL Score
Q314R	0.003	benign	0.281	Tolerated	-2.42	Neutral	0.067
I598N	0.33	benign	0.009	Deleterious	-5.49	Deleterious	0.141
T755I	1	probably damaging	0.001	Deleterious	-5.91	Deleterious	0.532
A1083G	0.003	benign	0.047	Deleterious	-2.21	Neutral	0.116
N1135S	0	benign	1	Tolerated	2.42	Neutral	0.121
H1297R	0	benign	0.401	Tolerated	0.71	Neutral	0.080

3.3.2 単量体および二量体 AOX1 タンパク質の発現量

まず初めに、WT および各 Mut AOX1 を一過性に強制発現させた HEK293T 細胞における総タンパク質量を、SDS-PAGE/WB にて評価した (Fig. 16). その結果, pcDNA3.1 vector を導入した mock と比較して、すべての AOX1 vector 導入細胞において AOX1 タンパク質量の増加が認められた (Fig. 16A). また WT AOX1 と他の Mut AOX1 間で、そのタンパク質量には差が認められなかった (Fig. 16B).

また AOX1 は分子間相互作用によりホモ二量体を形成することが知られており、この二量体形成がその代謝機能と関連することが報告されている⁹⁴⁾。そこで Native-PAGE/WB により、二量体 (300 kDa) の形成比率を評価した (Fig. 16C). その結果, WT と比較し T755I 変異のみ二量体量が 30%程度減少していることが明らかとなった。またその他の Mut AOX1 の二量体形成比率は WT と同等であった。

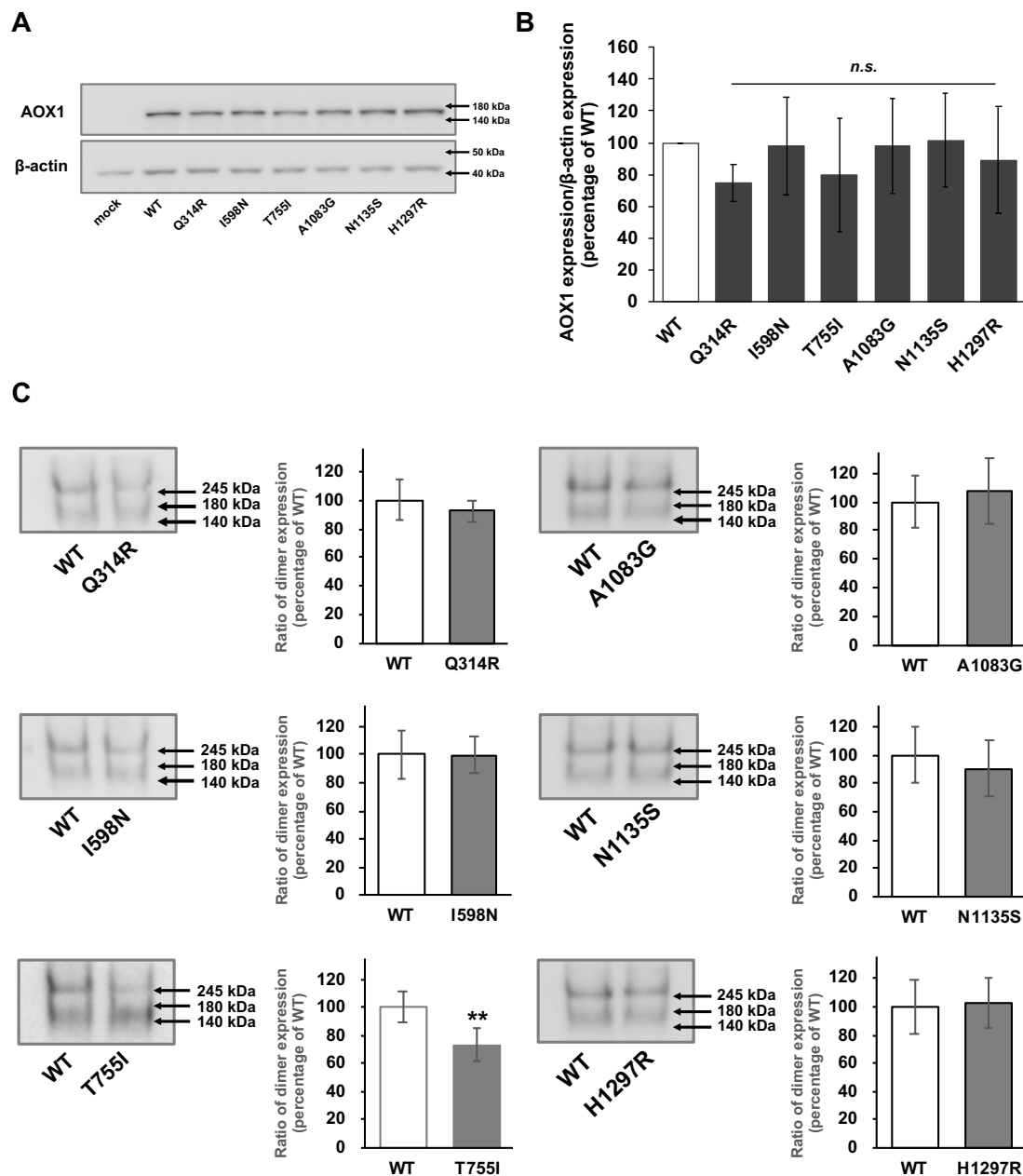


Figure 16 The expression of WT and Mut AOX1. (A) The expression of total AOX1 or β -actin protein was determined by SDS-PAGE/western blot assays. S9 fractions containing 10 μ g protein were applied. (B) AOX1 protein expression was quantified and normalized relative to that of β -actin. *n.s.*, not significant; Dunnett's test. (C) Dimeric or monomeric forms of WT and Mut AOX1. Dimer expression was calculated based the ratio of the area of the upper band (300 kDa) and total area of the upper and lower (150 kDa) bands. ** $p < 0.01$ compared with WT; unpaired Student's *t* test. Data are the means plus or minus *s.d.* of three independent experiments.

3.3.3 WT AOX1 の phthalazine 代謝評価

AOX1 典型基質である phthalazine を, mock あるいは WT AOX1 強制発現 HEK293T 細胞より得られた S9 画分と反応させた. そして生成された phthalazone の量を LC-MS/MS を用いて測定することで, AOX1 の酸化機能を評価することとした⁹⁵⁾. 時間依存的な酸化反応の推移を評価するため, 反応時間を 1–30 分として phthalazone の生成量を測定したところ, 15 分まで直線的な反応生成物の増加が見られた (Fig. 17A). また AOX1 選択的阻害剤として報告されている raloxifene (IC_{50} : 2.9 nM⁴¹⁾) を添加することで, WT AOX1 発現細胞における phthalazone の生成量が大幅に減少した (Fig. 17B). 以上の結果を踏まえ, 本評価系により AOX1 の機能を評価できることを確認し, 以降反応時間を 10 分間として検討を進めた.

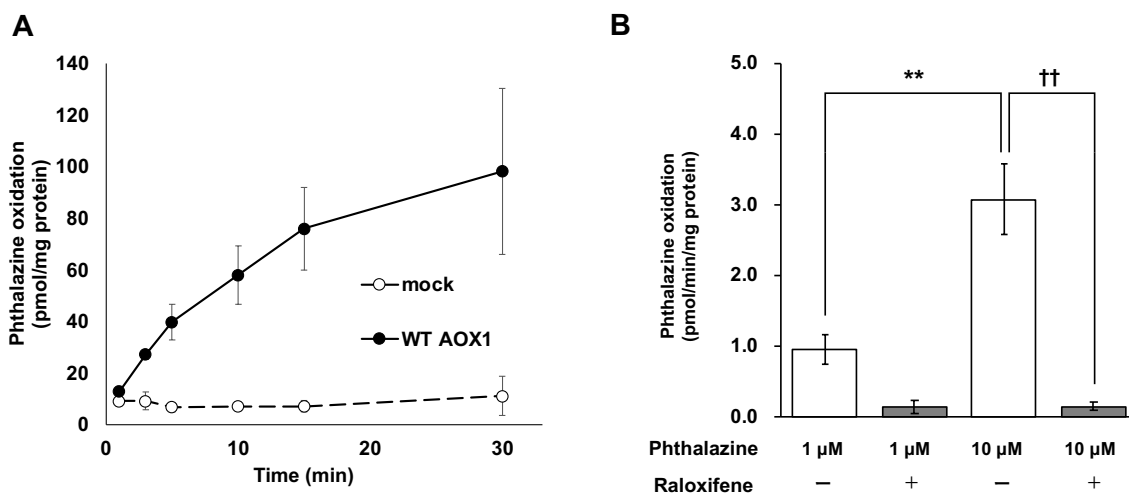


Figure 17 Enzymatic analysis using S9 fractions of WT AOX1-overexpressing HEK293T cells. (A) Time course of phthalazine oxidation. The substrates were incubated for 1–30 min at a concentration of 10 μ M. (B) Inhibition analysis of phthalazine metabolism. Raloxifene, a potent AOX1 inhibitor, was used at a concentration of 0.1 μ M. $**p < 0.01$ compared with the 1 μ M phthalazine control; $\dagger\dagger p < 0.01$ compared with the 10 μ M phthalazine control; Tukey's post hoc test. Data are the means plus or minus *s.d.* of three independent experiments.

3.3.4 WT および Mut AOX1 の phthalazine 酸化能の差異

3.3.3 で定めた反応条件を基に, WT および Mut AOX1 の代謝機能を評価した (Fig. 18A). その結果, T755I 変異では WT と比較して phthalazone の産生が有意に低下していることが示された. そこで, 各基質濃度における WT および T755I AOX1 機能を測定し, 酵素反応速度パラメーターを算出した (Fig. 18B). Michaelis-Menten kinetic model にフィッティングさせたところ, 基質との親和性を示す K_m 値には差が見られなかった一方で (K_m : WT, $2.28 \pm 0.24 \mu\text{M}$; T755I, $1.09 \pm 1.14 \mu\text{M}$), T755I では最大反応速度を示す $V_{\max}$ が低下していることが明らかとなった ($V_{\max}$: WT, $13.03 \pm 4.08 \text{ pmol/min/mg protein}$; T755I, $3.08 \pm 1.40 \text{ pmol/min/mg protein}$).

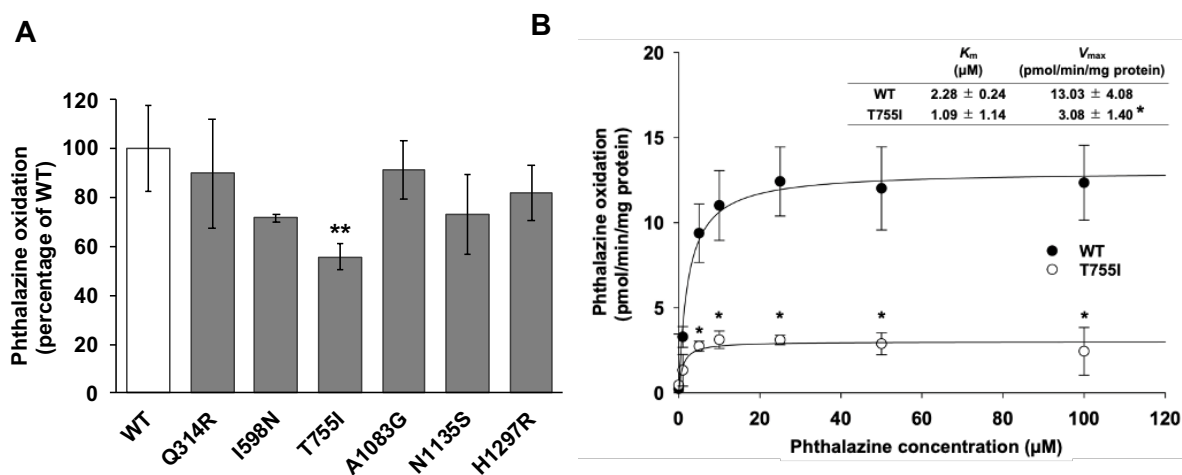


Figure 18 Comparison of the oxidation of phthalazine. (A) Ratio of phthalazone generation in Mut AOX1. $*p < 0.05$ compared with the WT; Dunnett's test. (B) Enzyme kinetic assay for the oxidation of phthalazine. Metabolism of 1–100 μM phthalazine to phthalazone was measured for 10 min at pH 7.4 using S9 fractions obtained from WT (filled circles) or T755I (open circles) AOX1 expressed in HEK293T cells. Plots were fitted to the Michaelis-Menten equation. $*p < 0.05$ compared with the WT; unpaired Student's *t* test. Data represent the means plus or minus *s.d.* of three independent experiments.

3.4 考察

本章では, AOX1 による代謝機能の個人差の要因を解明するため, コーディング領域においてアミノ酸が置換される nsSNPs に着目し, AOX1 機能を変動させる遺伝子多型の同定を目指した. 本検討では, 実臨床における AOX1 遺伝子多型に伴う, 基質薬物の動態および治療効果の検証を見据え, MAF が 1%以上の AOX1-SNPs に限定して評価を実施した (Table 5). 1KGP および gnomAD から得られた SNPs の MAF は概ね一致しており, N1135S や H1297R は比較的多くの集団に存在する変異である一方で, Q314R および A1083G はアフリカ人集団, I598N はラテン系/混血アメリカ人および東アジア人集団, T755I は東アジア人集団に特異的に存在する変異であることが明らかとなった. また, これらの遺伝子多型に伴うタンパク質機能への影響を予測したところ, T755I 変異は PolyPhen2, SIFT4G, PROVEAN, REVEL の全てのツールにおいて, deleterious あるいはスコアの増大を確認した. T755 は, homolog (mouse Aox1 [T750], mouse Aox2 [T761], mouse Aox3 [T751], mouse Aox4 [T753], rhesus monkey Aox1 [T755], rabbit Aox1 [T751]) および類縁遺伝子である human XDH [T747] でも保存されており, 代謝酵素として機能する上でも重要な残基であると推察される (Fig. 19).

Phthalazine を基質として用いた代謝能評価により, T755I は AOX1 活性を低下させることが明らかとなった. また, K_m は変化なく, V_{max} のみ減少したことから, この変異は基質結合部位に変化を与えずに触媒活性が低下させる変異である可能性が示された (Fig. 18). 加えて, SDS-PAGE/WB により評価した総 AOX1 発現量は, 6 種の Mut AOX1 および WT AOX1 で同等であった (Fig. 16). したがって, AOX1 強制発現 HEK293T 細胞中では, 上記の Mut AOX1 間におけるタンパク質の分解, 安定性に差異がないことが示唆された. また, Native-PAGE/WB により, T755I 変異に伴う二量体形成量の減少が確認された. 類似構造を有する XDH は, 二量体化によりサブユニットが協調的に基質の結合および酸化活性を向上させることが知られている⁹⁶⁾. 以上より, T755I 変異に伴う二量体量の低下が, AOX1 活性低下の要因の一つである可能性が示された.

```
Homo sapiens AOX1 : V D Q I L E G E I H M G G Q E H F Y M E T Q S M L V V P K G E D Q E M D V Y V S T Q : 755
Mus musculus Aox1 : V D Q I L E G E I H I G G Q E H F Y M E T Q S M L V V P K G E D G E I D I Y V S T Q : 750
Mus musculus Aox2 : V D Q V A E G T V H V G G Q E H F Y M E T Q R V L V I P K T E D K E L D M Y V S T Q : 761
Mus musculus Aox3 : A D Q I L E G E V H L G G Q E H F Y M E T Q S V R V V P K G E D K E M D I Y V S S Q : 751
Mus musculus Aox4 : V D Q I V E G E I H V E G Q E H F Y M E T Q T I L A I P Q T E D K E M V L H L G T Q : 753
Oryctolagus cuniculus Aox1 : V D Q I L E G E I H M G G Q E H F Y M E T Q S V L V V P K G E D Q E M D V Y A S T Q : 751
Macaca mulatta Aox1 : V D Q I L E G E I H M G G Q E H F Y M E T Q S M L V V P K G E D Q E M D V Y V S T Q : 755
Homo sapiens XDH : A D N V V S G E I Y I G G Q E H F Y L E T H C T I A V P K G E A G E M E L F V S T Q : 747
```

Figure 19 Multiple protein sequence alignments of mammalian aldehyde oxidase (AOX) and xanthine dehydrogenase (XDH). The alignments were generated using Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 under default parameters. The conserved threonine of AOX and XDH are highlighted in yellow.

AOX1 による酸化反応は、ドメイン III に位置する基質結合ポケット内の Moco を介して起こることが知られており、また酸化の過程で生じた電子は、[2Fe-2S] クラスターを介し FAD の位置するドメイン II へと伝達され、還元反応に利用されることが示唆されている。Foti らは、イタリア人集団で発見された AOX1 の遺伝子多型である S1271L (rs141786030) では、benzaldehyde の酸化活性における k_{cat} および K_m の減少に伴い触媒活性が低下することを明らかにしている⁹⁷⁾。基質に phthalazine を用いた際には、S1271L に伴う触媒活性の変化が見られず、加えて S1271 は酸化活性に重要な Moco に隣接する E1270 と共に基質結合ポケットに位置するアミノ酸残基であることから、この遺伝子多型は嵩高い基質化合物のターンオーバーに影響を与えることが推察される。したがって、遺伝子多型の影響を評価する上では、タンパク質中の立体配置を考慮することが重要である。本検討で調査の対象とした 6 種の AOX1-nsSNPs は、その多くがドメイン III に位置しているが、基質認識部位に隣接する変異は存在しなかった (Fig. 20)。

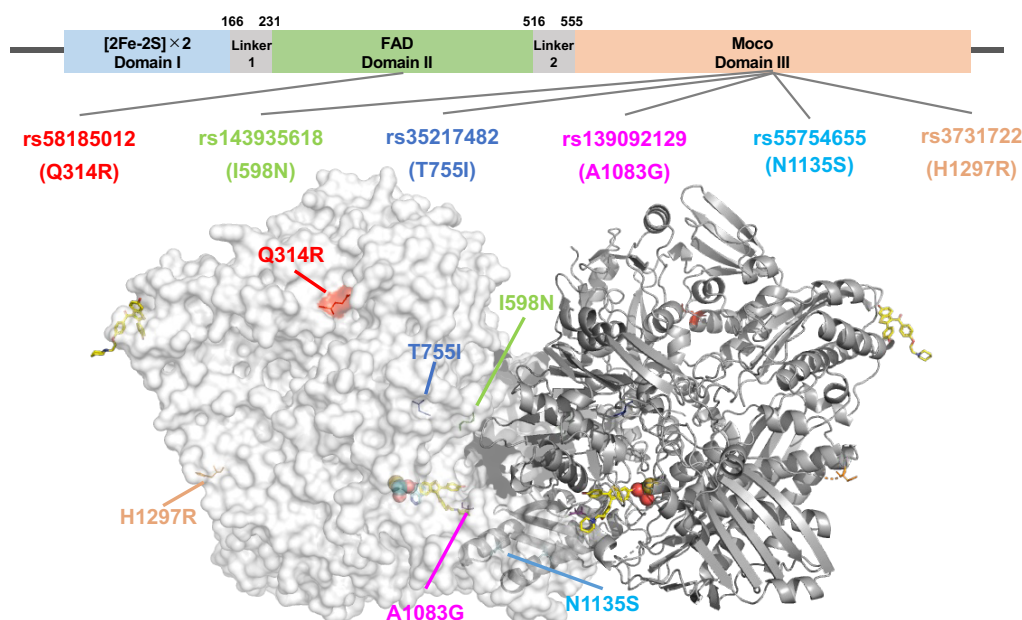


Figure 20 Location of nsSNPs of AOX1. The three-dimensional structure was obtained from the 4UHW Protein Data Bank. Amino acids and Moco were shown as stick representations. The AOX1 monomer of chain A is shown as a surface representation and chain B as a cartoon.

Schumann らは、*Rhodobacter capsulatus* に発現する XDH において、[2Fe-2S] クラスターが二量体形態および Moco の含有率、代謝活性化に重要であることを明らかにしている⁹⁸⁾。また Itoh らは、Donryu rat における G110S 変異が Aox1 の二量体形成および代謝活性の低下と関連していることを明らかにしている⁹⁴⁾。rat Aox1 の G110 に相当するアミノ酸残基である human AOX1 における G111 は、2 つの [2Fe-2S] クラスターから約 7.7–18.8 Å の距離に位置する。加えて Hartmann らは、[2Fe-2S] クラスター付近 (11.5–19.6 Å) の R802C 変異が、*Escherichia coli* を用いて生成された human AOX1 の二量体化

を喪失させることを明らかにした⁸⁴⁾。また WT および R802C 共に, AOX1 の二量体と比較して, 単量体では鉄とモリブデンの飽和度が低下していた。これらの知見に従うと, AOX 中への [2Fe-2S] クラスターおよび Moco の挿入は複合体形成および代謝活性を左右する重要なイベントであり, また [2Fe-2S] クラスターに近接するアミノ酸残基は, これらの補因子を含む AOX タンパク質のフォールディングにおいて重要な配列であることが推察される。本検討で見出された遺伝子多型の位置する T755 と [2Fe-2S] クラスター間の距離は 11.2–11.7Å であり, G110 および R802 と同程度に, AOX サブユニット間結合面および [2Fe-2S] クラスターの近くに位置している (Fig. 21)。一方で, [2Fe-2S] クラスターから離れて位置する N1135S は, WT と比較して単量体/二量体比に影響を与えなかった。以上より, T755I における [2Fe-2S] クラスター含有量の減少が, 二量体形成と酵素活性の低下の原因であることが示唆される。したがって, T755I は, phthalazine に限らず, 全ての AOX 基質の代謝活性低下に寄与すると推定される。

しかしながら, 本検討では各 Mut AOX1 における [2Fe-2S] クラスターの飽和度は測定しておらず, また [2Fe-2S] クラスター自体の複合体安定化効果に関する知見は得られていない。また, AOX による還元反応については検証されていないことから, FAD 付近の基質結合ポケットの構造や還元活性における, T755I 含めた Mut AOX1 の影響は不明である。したがって, 上記の二量体化のメカニズムおよび還元反応における遺伝子多型の影響を解明するためにも, 複数の基質化合物を用いた更なる検討が必要である。

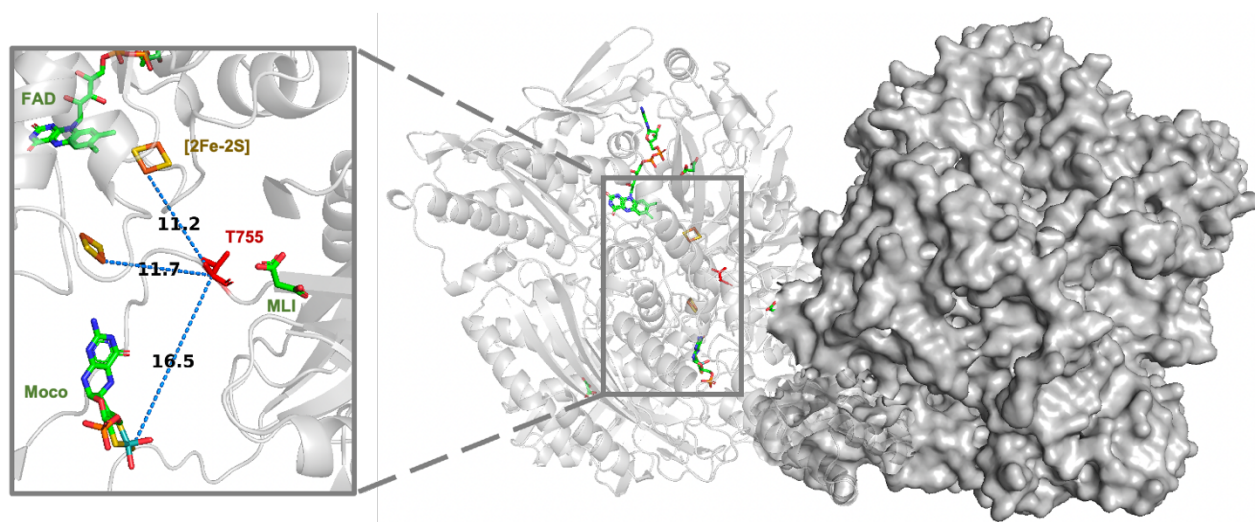


Figure 21 Location of T755 in WT AOX1. The three-dimensional structure was obtained from the 4UHW Protein Data Bank. T755, FAD, Moco, the [2Fe-2S] cluster, and the malonate ion (MLI) are shown as stick representations. The AOX1 monomer of chain A is shown as a cartoon, and chain B as a surface representation. The distance from the mutated amino acids is denoted by dashed lines.

既報において、H1297R および N1135S は phenanthridine を基質とした際に酸化活性が低下した一方で、benzaldehyde, chloroquinazolinone, phthalazine の酸化には影響を与えないことが知られている⁸⁴⁾。本検討においても、phthalazine を AOX1 基質として使用した結果、H1297R および N1135S に伴う AOX1 活性の増大は見られず、既報と一致する見解が得られた。したがって、各 Mut AOX1 の活性は、評価に用いる基質によって応答が異なる可能性がある。そこで、6-MP を基質として各 AOX1-SNPs による代謝活性変化の評価を試みた。しかしながら、本検討で使用した AOX1 発現系では、活性の低さから代謝物である 6-TX を検出できなかった (data not shown)。Barr らは、HLC と比較して、pET システムにより作製、精製された AOX では、活性が 11–14 倍程度低いことを報告している⁹⁹⁾。また、Corning 社 (HEK293 細胞より作製)、Xenotech 社 (*Escherichia coli* より作製) より販売されている AOX 含有濃縮調製物においても同様に、活性が低下していることが知られている。この発現系特異的な AOX 活性の変化は、フォールディング過程における立体構造中への MoCo および [2Fe-2S] クラスターの包接や、それに伴う二量体化の不完全性に加えて、モリブデン補因子の形成に重要な moco sulfurase の発現の欠如が要因である。*Escherichia coli* における sulfurase は Moco の硫化活性を有していないため、嫌気性条件下で硫化ナトリウム処理を行い活性硫化型に変換することで、AOX の活性評価に使用されている⁹⁷⁾。HEK293 細胞や sf9 細胞では、含モリブデン代謝酵素の活性化において *in vitro* による Moco の硫化や sulfurase の共発現は不要であるが¹⁰⁰⁾、潜在的な sulfurase 活性が AOX の代謝活性に影響を与えている可能性がある。以上より、AOX 強制発現系では、生体内での医薬品代謝における AOX 活性の評価が困難であることから、より活性の高い酵素の作製条件の探索が望まれる。また肝細胞中に含まれる AOX は、凍結保存までの時間によって活性が低下することが報告されている¹⁰¹⁾。したがって、購入した HLC を用いて AOX 活性を評価する際にも、新鮮肝細胞における代謝機能との差異があることを留意しておく必要がある。

3.5 小括

AOX1 における T755I 変異体は、総 AOX1 タンパク質発現量に影響を与えない一方で、二量体形成を抑制させることで、酵素活性を低下させることを明らかにした。T755I 変異は、東アジア人集団で特異的に見られる遺伝子多型であり、本検討が T755I に伴う代謝活性の低下を評価した初めての報告である。AOX1 の広範な基質特異性を考慮すると、T755I は多くの基質薬剤の治療効果や毒性と関連することが想定される。したがって、T755I の臨床的な重要性を確認するには、臨床研究を通じた包括的かつ詳細な調査が必要である。

総括

近年の医薬品開発において、薬物動態およびバイオアベイラビリティを起因とした開発中止事例が減少していることが知られている¹⁰²⁾。これは、ここ 20–30 年間における代謝酵素およびトランスポーター研究の著しい進展によるものであると言える。医薬品開発には、膨大な時間と費用を要することから、早期の正確な薬物動態予測は、効率的かつ治療効果の高い化合物の探索を行う上で必要不可欠である。現在の薬物動態予測においては、*in vitro-in vivo extrapolation* (IVIVE) が一般化しつつある。この手法は、古くより実験動物の体表面積を基準に予測されるアロメトリックスケーリングから、ヒト肝細胞および肝臓抽出物を用いた *in vitro* 評価モデル、小腸などの肝外組織におけるクリアランスを考慮したコンパートメントモデルへと、多角的に薬物動態研究が進展し知識が蓄積されたことで活用可能となった *in vivo* 外挿予測モデルである。CYP は薬物代謝の中核を担う酸化還元酵素であり、これまでもその基質認識機構や代謝活性評価系は広く認知、利用されている。今後、IVIVE モデルの予測精度向上には、CYP に限らない薬物代謝酵素における種差や肝外酵素活性の解明が重要と考えられる。

Non-CYP の一種である AOX は、前述した通りさまざまな医薬品の酸化還元に関連する代謝酵素であり、薬物の治療効果および副作用発現を予測する上で重要な代謝酵素であると推定される。また薬物代謝酵素としての側面以外にも、AOX は脂肪細胞における脂質蓄積やがん細胞における上皮間葉転換等の生理的機能にも関連していることが報告されている^{103–106)}。したがって、生体内基質の代謝を介した病態形成機構の解明および治療標的としても注目され得る代謝酵素である。第 1 章、第 2 章では、AZA の副作用発現ならびに 6-MP 動態における AOX 阻害薬剤の影響を評価した¹⁰⁷⁾。本研究から得られた知見は、チオプリン製剤の代謝における AOX の寄与に着目した結果ではあるが、その他の既存あるいは今後開発される AOX 基質医薬品のリスク管理を行う上での一助になると考えられる。また第 3 章では、AOX の個体間差を生み出す新規 SNPs である T755I を同定し、そのメカニズムに二量体形成量の低下が関連していることを明らかにした¹⁰⁸⁾。本検討では典型基質 *phthalazine* を用いた活性評価に限るが、AOX の代謝効率自体が低下している可能性を鑑みると、その他 AOX 基質医薬品や生体内基質の代謝においても、このアミノ酸変異に伴い代謝能が低下していることが推定される。以上の結果を踏まえ、今後 AOX を介した薬物間相互作用、ならびに T755I に伴う薬物動態変動について、臨床研究を通したより包括的かつ詳細な調査が必要であると考えられる。

参考文献

- 1) Argikar UA, Potter PM, Hutzler JM, Marathe PH. Challenges and Opportunities with Non-CYP Enzymes Aldehyde Oxidase, Carboxylesterase, and UDP-Glucuronosyltransferase: Focus on Reaction Phenotyping and Prediction of Human Clearance. *AAPS J.* 2016;18:1391-405. PMID: 27495117.
- 2) Pryde DC, Dalvie D, Hu Q, Jones P, Obach RS, Tran TD. Aldehyde oxidase: an enzyme of emerging importance in drug discovery. *J Med Chem.* 2010;53:8441-60. PMID: 20853847.
- 3) Ditttrich Ch, Greim G, Borner M, Weigang-Köhler K, Huisman H, Amelsberg A, Ehret A, Wanders J, Hanauske A, Fumoleau P. Phase I and pharmacokinetic study of BIBX 1382 BS, an epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor, given in a continuous daily oral administration. *Eur J Cancer.* 2002;38:1072-80. PMID: 12008195.
- 4) Hutzler JM, Yang YS, Albaugh D, Fullenwider CL, Schmenk J, Fisher MB. Characterization of aldehyde oxidase enzyme activity in cryopreserved human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2012;4:267-75. PMID: 22031625.
- 5) Hutzler JM, Cerny MA, Yang YS, Asher C, Wong D, Frederick K, Gilpin K. Cynomolgus monkey as a surrogate for human aldehyde oxidase metabolism of the EGFR inhibitor BIBX1382. *Drug Metab Dispos.* 2014;42:1751-60. PMID: 25035284.
- 6) Akabane T, Tanaka K, Irie M, Terashita S, Teramura T. Case report of extensive metabolism by aldehyde oxidase in humans: pharmacokinetics and metabolite profile of FK3453 in rats, dogs, and humans. *Xenobiotica.* 2011;41:372-84. PMID: 21385103.
- 7) Sanoh S, Nozaki K, Murai H, Terashita S, Teramura T, Ohta S. Prediction of human metabolism of FK3453 by aldehyde oxidase using chimeric mice transplanted with human or rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2012;40:76-82. PMID: 21984595.
- 8) Diamond S, Boer J, Maduskuie TP Jr, Falahatpisheh N, Li Y, Yeleswaram S. Species-specific metabolism of SGX523 by aldehyde oxidase and the toxicological implications. *Drug Metab Dispos.* 2010;38:1277-85. PMID: 20421447.
- 9) Zhang X, Liu HH, Weller P, Zheng M, Tao W, Wang J, Liao G, Monshouwer M, Peltz G. In silico and in vitro pharmacogenetics: aldehyde oxidase rapidly metabolizes a p38 kinase inhibitor. *Pharmacogenomics J.* 2011;11:15-24. PMID: 20177421.
- 10) Jensen KG, Jacobsen AM, Bundgaard C, Nilausen DØ, Thale Z, Chandrasena G, Jørgensen M. Lack of Exposure in a First-in-Man Study Due to Aldehyde Oxidase Metabolism: Investigated by Use of 14C-microdose, Humanized Mice, Monkey Pharmacokinetics, and In Vitro Methods. *Drug Metab Dispos.* 2017;45:68-75. PMID: 27737930.
- 11) Hanioka N, Saito K, Isobe T, Ohkawara S, Jinno H, Tanaka-Kagawa T. Favipiravir biotransformation in liver cytosol: Species and sex differences in humans, monkeys, rats, and mice. *Biopharm Drug Dispos.* 2021;42:218-25. PMID: 33754379.
- 12) Mishima E, Anzai N, Miyazaki M, Abe T. Uric Acid Elevation by Favipiravir, an Antiviral Drug. *Tohoku J Exp Med.* 2020;251:87-90. PMID: 32536670.
- 13) Demir E, Sütçüoğlu O, Demir B, Ünsal O, Yazıcı O. A possible interaction between favipiravir and methotrexate: Drug-induced hepatotoxicity in a patient with osteosarcoma. *J Oncol Pharm Pract.* 2022;28:445-8. PMID: 34255596.

- 14) Moriyama A, Ueda H, Narumi K, Asano S, Furugen A, Saito Y, Kobayashi M. Contribution of aldehyde oxidase to methotrexate-induced hepatotoxicity: in vitro and pharmacoepidemiological approaches. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2024;20:399-406. PMID: 38706380.
- 15) Choughule KV, Barnaba C, Joswig-Jones CA, Jones JP. In vitro oxidative metabolism of 6-mercaptopurine in human liver: insights into the role of the molybdoflavoenzymes aldehyde oxidase, xanthine oxidase, and xanthine dehydrogenase. *Drug Metab Dispos.* 2014;42:1334-40. PMID: 24824603.
- 16) Amano T, Fukami T, Ogiso T, Hirose D, Jones JP, Taniguchi T, Nakajima M. Identification of enzymes responsible for dantrolene metabolism in the human liver: A clue to uncover the cause of liver injury. *Biochem Pharmacol.* 2018;151:69-78. PMID: 29522712.
- 17) Konishi K, Fukami T, Gotoh S, Nakajima M. Identification of enzymes responsible for nitrazepam metabolism and toxicity in human. *Biochem Pharmacol.* 2017;140:150-60. PMID: 28606603.
- 18) Ogiso T, Fukami T, Mishiro K, Konishi K, Jones JP, Nakajima M. Substrate selectivity of human aldehyde oxidase 1 in reduction of nitroaromatic drugs. *Arch Biochem Biophys.* 2018;659:85-92. PMID: 30367827.
- 19) Renwick AB, Ball SE, Tredger JM, Price RJ, Walters DG, Kao J, Scatina JA, Lake BG. Inhibition of zaleplon metabolism by cimetidine in the human liver: in vitro studies with subcellular fractions and precision-cut liver slices. *Xenobiotica.* 2002;32:849-62. PMID: 12419015.
- 20) Macpherson IR, Poondru S, Simon GR, Gedrich R, Brock K, Hopkins CA, Stewart K, Stephens A, Evans TR. A phase 1 study of OSI-930 in combination with erlotinib in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer.* 2013;49:782-9. PMID: 23099006.
- 21) Tang LWT, Shi Y, Sharma R, Obach RS. The Drug-Drug Interaction between Erlotinib and OSI-930 Is Mediated through Aldehyde Oxidase Inhibition. *Drug Metab Dispos.* 2024;52:1020-8. PMID: 38889967.
- 22) Liu J, Vernikovskaya D, Bora G, Carlo A, Burchett W, Jordan S, Tang LWT, Yang J, Che Y, Chang G, Troutman MD, Di L. Novel Multiplexed High Throughput Screening of Selective Inhibitors for Drug-Metabolizing Enzymes Using Human Hepatocytes. *AAPS J.* 2024;26:36. PMID: 38546903.
- 23) Tang LWT, DaSilva E, Lapham K, Obach RS. Evaluation of Icotinib as a Potent and Selective Inhibitor of Aldehyde Oxidase for Reaction Phenotyping in Human Hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2024;52:565-73. PMID: 38565303.
- 24) Fiala O, Hosek P, Pesek M, Finek J, Racek J, Stehlik P, Sorejs O, Minarik M, Benesova L, Celer A, Nemcova I, Kucera R, Topolcan O. Serum Concentration of Erlotinib and its Correlation with Outcome and Toxicity in Patients with Advanced-stage NSCLC. *Anticancer Res.* 2017;37:6469-76. PMID: 29061834.
- 25) Fu C, Di L, Han X, Soderstrom C, Snyder M, Troutman MD, Obach RS, Zhang H. Aldehyde oxidase 1 (AOX1) in human liver cytosols: quantitative characterization of AOX1 expression level and activity relationship. *Drug Metab Dispos.* 2013;41:1797-804. PMID: 23857892.

- 26) Carroll MB, Smith DM, Shaak TL. Genomic sequencing of uric acid metabolizing and clearing genes in relationship to xanthine oxidase inhibitor dose. *Rheumatol Int.* 2017;37:445-53. PMID: 27798726.
- 27) Ramírez J, Kim TW, Liu W, Myers JL, Mirkov S, Owzar K, Watson D, Mulkey F, Gamazon ER, Stock W, Undevia S, Innocenti F, Ratain MJ. A pharmacogenetic study of aldehyde oxidase I in patients treated with XK469. *Pharmacogenet Genomics.* 2014;24:129-32. PMID: 24300566.
- 28) Chaparro M, Ordás I, Cabré E, Garcia-Sanchez V, Bastida G, Peñalva M, Gomollón F, García-Planella E, Merino O, Gutiérrez A, Esteve M, Márquez L, García-Sepulcre M, Hinojosa J, Vera I, Muñoz F, Mendoza JL, Cabriada JL, Montoro MA, Barreiro-de Acosta M, Ceña G, Saro C, Aldeguer X, Barrio J, Maté J, Gisbert JP. Safety of thiopurine therapy in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 3931 patients. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19:1404-10. PMID: 23665964.
- 29) Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut.* 2002;50:485-9. PMID: 11889067.
- 30) Feng R, Guo J, Zhang SH, Qiu Y, Chen BL, He Y, Zeng ZR, Ben-Horin S, Chen MH, Mao R. Low 6-thioguanine nucleotide level: Effective in maintaining remission in Chinese patients with Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2019;34:679-85. PMID: 30175864.
- 31) Hindorf U, Lindqvist M, Hildebrand H, Fagerberg U, Almer S. Adverse events leading to modification of therapy in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24:331-42. PMID: 16842460.
- 32) Chapdelaine A, Mansour AM, Troyanov Y, Williamson DR, Doré M. Metabolite monitoring to guide thiopurine therapy in systemic autoimmune diseases. *Clin Rheumatol.* 2017;36:1341-8. PMID: 28130685.
- 33) Higgs JE, Payne K, Roberts C, Newman WG. Are patients with intermediate TPMT activity at increased risk of myelosuppression when taking thiopurine medications? *Pharmacogenomics.* 2010;11:177-88. PMID: 20136357.
- 34) Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY, Pui CH, Evans WE. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91:2001-8. PMID: 10580024.
- 35) van Egmond R, Chin P, Zhang M, Sies CW, Barclay ML. High TPMT enzyme activity does not explain drug resistance due to preferential 6-methylmercaptopurine production in patients on thiopurine treatment. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;35:1181-9. PMID: 22486532.
- 36) Jharap B, Seinen ML, de Boer NK, van Ginkel JR, Linskens RK, Kneppelhout JC, Mulder CJ, van Bodegraven AA. Thiopurine therapy in inflammatory bowel disease patients: analyses of two 8-year intercept cohorts. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16:1541-9. PMID: 20155846.
- 37) Tanaka Y, Kato M, Hasegawa D, Urayama KY, Nakadate H, Kondoh K, Nakamura K, Koh K, Komiyama T, Manabe A. Susceptibility to 6-MP toxicity conferred by a NUDT15 variant in Japanese children with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2015;171:109-15. PMID: 26033531.

- 38) Yang SK, Hong M, Baek J, Choi H, Zhao W, Jung Y, Haritunians T, Ye BD, Kim KJ, Park SH, Park SK, Yang DH, Dubinsky M, Lee I, McGovern DP, Liu J, Song K. A common missense variant in NUDT15 confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia. *Nat Genet.* 2014;46:1017-20. PMID: 25108385.
- 39) Kurzawski M, Dziewanowski K, Safranow K, Drozdziak M. Polymorphism of genes involved in purine metabolism (XDH, AOX1, MOCOS) in kidney transplant recipients receiving azathioprine. *Ther Drug Monit.* 2012;34:266-74. PMID: 22495427.
- 40) Smith MA, Marinaki AM, Arenas M, Shobowale-Bakre M, Lewis CM, Ansari A, Duley J, Sanderson JD. Novel pharmacogenetic markers for treatment outcome in azathioprine-treated inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009;30:375-84. PMID: 19500084.
- 41) Obach RS, Huynh P, Allen MC, Beedham C. Human liver aldehyde oxidase: inhibition by 239 drugs. *J Clin Pharmacol.* 2004;44:7-19. PMID: 14681337.
- 42) Bate A, Evans SJ. Quantitative signal detection using spontaneous ADR reporting. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2009;18:427-36. PMID: 19358225.
- 43) Almenoff JS, DuMouchel W, Kindman LA, Yang X, Fram D. Disproportionality analysis using empirical Bayes data mining: a tool for the evaluation of drug interactions in the post-marketing setting. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2003;12:517-21. PMID: 14513665.
- 44) Noguchi Y, Yoshizawa S, Aoyama K, Kubo S, Tachi T, Teramachi H. Verification of the "Upward Variation in the Reporting Odds Ratio Scores" to Detect the Signals of Drug-Drug Interactions. *Pharmaceutics.* 2021;13:1531. PMID: 34683823.
- 45) Noguchi Y, Takaoka M, Hayashi T, Tachi T, Teramachi H. Antiepileptic combination therapy with Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: Analysis of a Japanese pharmacovigilance database. *Epilepsia.* 2020;61:1979-89. PMID: 32761907.
- 46) Norén GN, Sundberg R, Bate A, Edwards IR. A statistical methodology for drug-drug interaction surveillance. *Stat Med.* 2008;27:3057-70. PMID: 18344185.
- 47) Yokouchi C, Nishimura Y, Goto H, Sato M, Hidoh Y, Takeuchi K, Ishii Y. Reduction of fatty liver in rats by nicotinamide via the regeneration of the methionine cycle and the inhibition of aldehyde oxidase. *J Toxicol Sci.* 2021;46:31-42. PMID: 33408299.
- 48) Tucker GT, Houston JB, Huang SM. Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential-toward a consensus. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;70:103-14. PMID: 11503003.
- 49) Gardiner SJ, Gearry RB, Burt MJ, Chalmers-Watson T, Chapman BA, Ross AG, Stedman CA, Huelsen A, Barclay ML. Allopurinol might improve response to azathioprine and 6-mercaptopurine by correcting an unfavorable metabolite ratio. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26:49-54. PMID: 21175793.
- 50) Qian Y, Ye X, Du W, Ren J, Sun Y, Wang H, Luo B, Gao Q, Wu M, He J. A computerized system for detecting signals due to drug-drug interactions in spontaneous reporting systems. *Br J Clin Pharmacol.* 2010;69:67-73. PMID: 20078614.

- 51) Wilson A, Jansen LE, Rose RV, Gregor JC, Ponich T, Chande N, Khanna R, Yan B, Jairath V, Khanna N, Sey M, Beaton M, McIntosh K, Teft WA, Kim RB. HLA-DQA1-HLA-DRB1 polymorphism is a major predictor of azathioprine-induced pancreatitis in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018;47:615-20. PMID: 29270995.
- 52) Hall WW, Krenitsky TA. Aldehyde oxidase from rabbit liver: specificity toward purines and their analogs. *Arch Biochem Biophys.* 1986;251:36-46. PMID: 3789740.
- 53) Rashidi MR, Beedham C, Smith JS, Davaran S. In vitro study of 6-mercaptopurine oxidation catalysed by aldehyde oxidase and xanthine oxidase. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2007;22:299-306. PMID: 17827784.
- 54) Kulkarni P, Karanam A, Gurjar M, Dhoble S, Naik AB, Vidhun BH, Gota V. Effect of various anticoagulants on the bioanalysis of drugs in rat blood: implication for pharmacokinetic studies of anticancer drugs. *Springerplus.* 2016;5:2102. PMID: 28053832.
- 55) Sasaki H, Tsuru K, Nakamura J, Konishi R, Shibasaki J. Effect of allopurinol on the first-pass metabolism of 6-mercaptopurine in the rat. *Biochem Pharmacol.* 1987;36:4175-6. PMID: 3689444.
- 56) Li C, Su Z, Ge L, Chen Y, Chen X, Li Y. Cardioprotection of hydralazine against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Eur J Pharmacol.* 2020;869:172850. PMID: 31830459.
- 57) Takeuchi K, Yokouchi C, Goto H, Umehara K, Yamada H, Ishii Y. Alleviation of fatty liver in a rat model by enhancing N¹-methylnicotinamide bioavailability through aldehyde oxidase inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;507:203-10. PMID: 30446221.
- 58) Kobayashi Y, Ohshiro N, Tsuchiya A, Kohyama N, Ohbayashi M, Yamamoto T. Renal transport of organic compounds mediated by mouse organic anion transporter 3 (mOat3): further substrate specificity of mOat3. *Drug Metab Dispos.* 2004;32:479-83. PMID: 15100168.
- 59) Barr JT, Jones JP. Evidence for substrate-dependent inhibition profiles for human liver aldehyde oxidase. *Drug Metab Dispos.* 2013;41:24-9. PMID: 22996261.
- 60) セロクエル錠,細粒 インタビューフォーム, アステラス製薬株式会社, 第 33 版 2023 年 10 月改訂
- 61) コントミン糖衣錠 インタビューフォーム, 田辺三菱製薬株式会社, 第 13 版 2021 年 1 月改訂
- 62) Nishino T, Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T. Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J.* 2008;275:3278-89. PMID: 18513323.
- 63) Waud WR, Rajagopalan KV. Purification and properties of the NAD⁺-dependent (type D) and O₂-dependent (type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* 1976;172:354-64. PMID: 176939.
- 64) Vorbach C, Scriven A, Capecchi MR. The housekeeping gene xanthine oxidoreductase is necessary for milk fat droplet enveloping and secretion: gene sharing in the lactating mammary gland. *Genes Dev.* 2002;16:3223-35. PMID: 12502743.

- 65) Elion GB. Significance of azathioprine metabolites. *Proc R Soc Med.* 1972;65:257-60. PMID: 5083313.
- 66) Gawlik-Dziki U, Dziki D, Świeca M, Nowak R. Mechanism of action and interactions between xanthine oxidase inhibitors derived from natural sources of chlorogenic and ferulic acids. *Food Chem.* 2017;225:138-45. PMID: 28193407.
- 67) Shi YW, Wang CP, Liu L, Liu YL, Wang X, Hong Y, Li Z, Kong LD. Antihyperuricemic and nephroprotective effects of resveratrol and its analogues in hyperuricemic mice. *Mol Nutr Food Res.* 2012;56:1433-44. PMID: 22865646.
- 68) Ullah Z, Yue P, Mao G, Zhang M, Liu P, Wu X, Zhao T, Yang L. A comprehensive review on recent xanthine oxidase inhibitors of dietary based bioactive substances for the treatment of hyperuricemia and gout: Molecular mechanisms and perspective. *Int J Biol Macromol.* 2024;278:134832. PMID: 39168219.
- 69) Guercioli R, Szumlanski C, Weinshilboum RM. Human liver xanthine oxidase: nature and extent of individual variation. *Clin Pharmacol Ther.* 1991;50:663-72. PMID: 1752110.
- 70) Saruwatari J, Nakagawa K, Shindo J, Tajiri T, Fujieda M, Yamazaki H, Kamataki T, Ishizaki T. A population phenotyping study of three drug-metabolizing enzymes in Kyushu, Japan, with use of the caffeine test. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;72:200-8. PMID: 12189367.
- 71) Kudo M, Moteki T, Sasaki T, Konno Y, Ujiie S, Onose A, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M. Functional characterization of human xanthine oxidase allelic variants. *Pharmacogenet Genomics.* 2008;18:243-51. PMID: 18300946.
- 72) Terao M, Garattini E, Romão MJ, Leimkühler S. Evolution, expression, and substrate specificities of aldehyde oxidase enzymes in eukaryotes. *J Biol Chem.* 2020;295:5377-89. PMID: 32144208.
- 73) Basit A, Fan PW, Khojasteh SC, Murray BP, Smith BJ, Heyward S, Prasad B. Comparison of Tissue Abundance of Non-Cytochrome P450 Drug-Metabolizing Enzymes by Quantitative Proteomics between Humans and Laboratory Animal Species. *Drug Metab Dispos.* 2022;50:197-203. PMID: 34969659.
- 74) Uehara S, Yoneda N, Higuchi Y, Yamazaki H, Suemizu H. Oxidative metabolism and pharmacokinetics of the EGFR inhibitor BIBX1382 in chimeric NOG-TKm30 mice transplanted with human hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2021;41:100419. PMID: 34624627.
- 75) Morrison RD, Blobaum AL, Byers FW, Santomango TS, Bridges TM, Stec D, Brewer KA, Sanchez-Ponce R, Corlew MM, Rush R, Felts AS, Manka J, Bates BS, Venable DF, Rodriguez AL, Jones CK, Niswender CM, Conn PJ, Lindsley CW, Emmitte KA, Daniels JS. The role of aldehyde oxidase and xanthine oxidase in the biotransformation of a novel negative allosteric modulator of metabotropic glutamate receptor subtype 5. *Drug Metab Dispos.* 2012;40:1834-45. PMID: 22711749.
- 76) Crouch RD, Blobaum AL, Felts AS, Conn PJ, Lindsley CW. Species-Specific Involvement of Aldehyde Oxidase and Xanthine Oxidase in the Metabolism of the Pyrimidine-Containing mGlu₅-Negative Allosteric Modulator VU0424238 (Auglurant). *Drug Metab Dispos.* 2017;45:1245-59. PMID: 28939686.

- 77) Itoh K. Individual and strain differences of aldehyde oxidase in the rat. *Yakugaku Zasshi*. 2009;129:1487-93. PMID: 19952527.
- 78) Tayama Y, Sugihara K, Sanoh S, Miyake K, Kitamura S, Ohta S. Xanthine oxidase and aldehyde oxidase contribute to allopurinol metabolism in rats. *J Pharm Health Care Sci*. 2022;8:31. PMID: 36476607.
- 79) Takaoka N, Sanoh S, Okuda K, Kotake Y, Sugahara G, Yanagi A, Ishida Y, Tateno C, Tayama Y, Sugihara K, Kitamura S, Kurosaki M, Terao M, Garattini E, Ohta S. Inhibitory effects of drugs on the metabolic activity of mouse and human aldehyde oxidases and influence on drug-drug interactions. *Biochem Pharmacol*. 2018;154:28-38. PMID: 29678521.
- 80) El-Sheikh AA, Greupink R, Wortelboer HM, van den Heuvel JJ, Schreurs M, Koenderink JB, Masereeuw R, Russel FG. Interaction of immunosuppressive drugs with human organic anion transporter (OAT) 1 and OAT3, and multidrug resistance-associated protein (MRP) 2 and MRP4. *Transl Res*. 2013;162:398-409. PMID: 24036158.
- 81) Liu C, Janke LJ, Yang JJ, Evans WE, Schuetz JD, Relling MV. Differential effects of thiopurine methyltransferase (TPMT) and multidrug resistance-associated protein gene 4 (MRP4) on mercaptopurine toxicity. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2017;80:287-93. PMID: 28623449.
- 82) Ban H, Andoh A, Imaeda H, Kobori A, Bamba S, Tsujikawa T, Sasaki M, Saito Y, Fujiyama Y. The multidrug-resistance protein 4 polymorphism is a new factor accounting for thiopurine sensitivity in Japanese patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2010;45:1014-21. PMID: 20393862.
- 83) Jelovac M, Kotur N, Ristivojevic B, Pavlovic D, Spasovski V, Damjanov N, Pavlovic S, Zukic B. Can Pharmacogenetic Variants in *TPMT*, *MTHFR* and *SLCO1B1* Genes Be Used as Potential Markers of Outcome Prediction in Systemic Sclerosis Patients? *Int J Mol Sci*. 2023;24:8538. PMID: 37239884.
- 84) Hartmann T, Terao M, Garattini E, Teutloff C, Alfaro JF, Jones JP, Leimkühler S. The impact of single nucleotide polymorphisms on human aldehyde oxidase. *Drug Metab Dispos*. 2012;40:856-64. PMID: 22279051.
- 85) 1000 Genomes Project Consortium; Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;526:68-74. PMID: 26432245.
- 86) Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, Collins RL, Laricchia KM, Ganna A, Birnbaum DP, Gauthier LD, Brand H, Solomonson M, Watts NA, Rhodes D, Singer-Berk M, England EM, Seaby EG, Kosmicki JA, Walters RK, Tashman K, Farjoun Y, Banks E, Poterba T, Wang A, Seed C, Whiffin N, Chong JX, Samocha KE, Pierce-Hoffman E, Zappala Z, O'Donnell-Luria AH, Minikel EV, Weisburd B, Lek M, Ware JS, Vittal C, Armean IM, Bergelson L, Cibulskis K, Connolly KM, Covarrubias M, Donnelly S, Ferriera S, Gabriel S, Gentry J, Gupta N, Jeandet T, Kaplan D, Llanwarne C, Munshi R, Novod S, Petrillo N, Roazen D, Ruano-Rubio V, Saltzman A, Schleicher M, Soto J, Tibbetts K, Tolonen C, Wade G, Talkowski ME; Genome Aggregation Database Consortium; Neale BM, Daly MJ, MacArthur DG. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 2020;581:434-43. PMID: 32461654.

- 87) Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013;Chapter 7:Unit7.20. PMID: 23315928.
- 88) Sim NL, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:W452-7. PMID: 22689647.
- 89) Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* 2015;31:2745-7. PMID: 25851949.
- 90) Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, Musolf A, Li Q, Holzinger E, Karyadi D, Cannon-Albright LA, Teerlink CC, Stanford JL, Isaacs WB, Xu J, Cooney KA, Lange EM, Schleutker J, Carpten JD, Powell IJ, Cussenot O, Cancel-Tassin G, Giles GG, MacInnis RJ, Maier C, Hsieh CL, Wiklund F, Catalona WJ, Foulkes WD, Mandal D, Eeles RA, Kote-Jarai Z, Bustamante CD, Schaid DJ, Hastie T, Ostrander EA, Bailey-Wilson JE, Radivojac P, Thibodeau SN, Whittemore AS, Sieh W. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet*. 2016;99:877-85. PMID: 27666373.
- 91) Coelho C, Foti A, Hartmann T, Santos-Silva T, Leimkühler S, Romão MJ. Structural insights into xenobiotic and inhibitor binding to human aldehyde oxidase. *Nat Chem Biol*. 2015;11:779-83. PMID: 26322824.
- 92) Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol*. 2021;38:3022-7. PMID: 33892491.
- 93) Garattini E, Mendel R, Romão MJ, Wright R, Terao M. Mammalian molybdo-flavoenzymes, an expanding family of proteins: structure, genetics, regulation, function and pathophysiology. *Biochem J*. 2003;372:15-32. PMID: 12578558.
- 94) Itoh K, Maruyama H, Adachi M, Hoshino K, Watanabe N, Tanaka Y. Lack of formation of aldehyde oxidase dimer possibly due to 377G>A nucleotide substitution. *Drug Metab Dispos*. 2007;35:1860-4. PMID: 17639027.
- 95) Panoutsopoulos GI, Beedham C. Enzymatic oxidation of phthalazine with guinea pig liver aldehyde oxidase and liver slices: inhibition by isovanillin. *Acta Biochim Pol*. 2004;51:943-51. PMID: 15625566.
- 96) Tai LA, Hwang KC. Cooperative catalysis in the homodimer subunits of xanthine oxidase. *Biochemistry* 2004;43:4869-76. PMID: 15096056.
- 97) Foti A, Hartmann T, Coelho C, Santos-Silva T, Romão MJ, Leimkühler S. Optimization of the Expression of Human Aldehyde Oxidase for Investigations of Single-Nucleotide Polymorphisms. *Drug Metab Dispos*. 2016;44:1277-85. PMID: 26842593.
- 98) Schumann S, Saggi M, Möller N, Anker SD, Lenzian F, Hildebrandt P, Leimkühler S. The mechanism of assembly and cofactor insertion into *Rhodobacter capsulatus* xanthine dehydrogenase. *J Biol Chem*. 2008;283:16602-11. PMID: 18390908.
- 99) Barr JT, Jones JP, Joswig-Jones CA, Rock DA. Absolute quantification of aldehyde oxidase protein in human liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Mol Pharm*. 2013;10:3842-9. PMID: 24006961.

- 100) Cronin CN, Liu J, Grable N, Strelevitz TJ, Obach RS, Carlo A. Production of active recombinant human aldehyde oxidase (AOX) in the baculovirus expression vector system (BEVS) and deployment in a pre-clinical fraction-of-control AOX compound exposure assay. *Protein Expr Purif.* 2021;177:105749. PMID: 32911062.
- 101) Hutzler JM, Yang YS, Brown C, Heyward S, Moeller T. Aldehyde oxidase activity in donor-matched fresh and cryopreserved human hepatocytes and assessment of variability in 75 donors. *Drug Metab Dispos.* 2014;42:1090-7. PMID: 24713130.
- 102) Arrowsmith J, Miller P. Trial watch: phase II and phase III attrition rates 2011-2012. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12:569. PMID: 23903212.
- 103) Neumeier M, Weigert J, Schäffler A, Weiss TS, Schmidl C, Büttner R, Bollheimer C, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C. Aldehyde oxidase 1 is highly abundant in hepatic steatosis and is downregulated by adiponectin and fenofibric acid in hepatocytes *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;350:731-5. PMID: 17022944.
- 104) Weigert J, Neumeier M, Bauer S, Mages W, Schnitzbauer AA, Obed A, Gröschl B, Hartmann A, Schäffler A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C. Small-interference RNA-mediated knock-down of aldehyde oxidase 1 in 3T3-L1 cells impairs adipogenesis and adiponectin release. *FEBS Lett.* 2008;582:2965-72. PMID: 18671973.
- 105) Vantaku V, Putluri V, Bader DA, Maity S, Ma J, Arnold JM, Rajapakshe K, Donepudi SR, von Rundstedt FC, Devarakonda V, Dubrulle J, Karanam B, McGuire SE, Stossi F, Jain AK, Coarfa C, Cao Q, Sikora AG, Villanueva H, Kavuri SM, Lotan Y, Sreekumar A, Putluri N. Epigenetic loss of AOX1 expression via EZH2 leads to metabolic deregulations and promotes bladder cancer progression. *Oncogene* 2020;39:6265-85. PMID: 31383940.
- 106) Zhao L, Li Y, Zhang Z, Zou J, Li J, Wei R, Guo Q, Zhu X, Chu C, Fu X, Yue J, Li X. Meta-analysis based gene expression profiling reveals functional genes in ovarian cancer. *Biosci Rep.* 2020;40:BSR20202911. PMID: 33135729.
- 107) Ueda H, Narumi K, Furugen A, Saito Y, Kobayashi M. Thers35217482 (T755I) single-nucleotide polymorphism in aldehyde oxidase-1 attenuates protein dimer formation and reduces the rates of phthalazine metabolism. *Drug Metab Dispos.* 2022;50:1126-31. PMID: 35842227.
- 108) Ueda H, Narumi K, Asano S, Saito Y, Furugen A, Kobayashi M. Comparative study on the occurrence of adverse effects in the concomitant use of azathioprine and aldehyde oxidase inhibitors. *Expert Opin Drug Saf.* 2024;23:89-97. PMID: 38097359.

謝辞

本研究を遂行するにあたり終始変わらぬ御指導, 御鞭撻を賜りました, 北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 小林 正紀 教授に厚く御礼申し上げます.

また, 本論文の副査として御審査を賜りました, 北海道大学大学院薬学研究院薬物動態解析学研究室/北海道大学病院 菅原 満 教授, 北海道大学病院 武隈 洋 准教授, ならびに 北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 鳴海 克哉 講師に謹んで感謝申し上げます.

さらに多くの有益な御助言, 御指導をいただきました, 慶應義塾大学薬学部ヘルスケア・イノベーション薬学講座 古堅 彩子 准教授, ならびに 北海道大学大学院薬学研究院臨床薬剤学研究室 岡本 敬介 助教に深く感謝申し上げます.

また, 学部在籍時よりご指導賜りました 北海道大学 井関 健 名誉教授, 研究生生活を送る中で, 多くの部分での支えとなってくださった 旭川十仁薬局 代表取締役社長 野田 敏宏 博士, ならびに 臨床薬剤学研究室の全ての方々に深く感謝申し上げます.

最後に, これまで経済的にも精神的にも, 長きに亘って支え見守ってくれた家族に心より感謝の意を表します.

2025 年 3 月
上田 一奈太