S2-05

非ステロイド性抗炎症薬の代謝に関与する ヒトP450分子種：CYP2C subfamily による メフェナム酸とジクロフェナックの代謝

- ¹⁾ 国立国際医療センター・研究所・臨床薬理
²⁾ 国立国際医療センター・外科、³⁾ 東京理科大学・薬学部・薬剤
⁴⁾ 住友化学・生物環境科学研究所、⁵⁾ 同・生命工学研究所

○千葉 寛¹⁾、斉藤敦子^{1,3)}、千葉登美枝¹⁾、石崎高志¹⁾、谷 昌尚²⁾
林 正弘³⁾、松井正義⁴⁾、斯波久二雄⁴⁾、金子秀雄⁴⁾
中塚 巖⁴⁾、薮崎義康⁵⁾、中沢 宏⁵⁾

ISOFORM(S) OF CYTOCHROME P450 RESPONSIBLE FOR THE METABOLISM
OF NONSTEROIDAL ANTIINFLAMMATORY DRUGS: OXIDATIVE METABOLISM
OF MEFENAMIC ACID AND DICLOFENAC BY CYP2C SUBFAMILY

Kan CHIBA, Atuko SAITOH, Tomie CHIBA, Takashi ISHIZAKI,
Masanao TANI, Masahiro HAYASHI, Masayoshi MATUI,
Kunio SHIBA, Hideo KANEKO, Iwao NAKATUKA,
Yoshiyasu YABUSAKI, Hiroshi NAKAZAWA

Department of Clinical Pharmacology and Division of General Surgery,
International Medical Center of Japan, Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Science University of Tokyo and Environmental Health
Science Laboratory and Biotechnology Laboratory, Sumitomo Chemical Co.

【緒言】 メフェナム酸はフェナム酸系の、ジクロフェナックはアリール酢酸系の非ステロイド性抗炎症薬であり、消炎、鎮痛薬として広く臨床で使用されている薬物である。ヒトにおける主要代謝経路は、メフェナム酸の場合3'-位のメチル基の水酸化であり、ジクロフェナックでは4'-位の水酸化である(図1)。最近、ピロキシカム、イブプロフェン、ナプロキセン等、一連の非ステロイド性抗炎症薬の代謝に、トルブタミドの代謝に関与するP450分子種が関係していることを示唆する報告がなされている¹⁻³⁾。トルブタミドの代謝に関与しているP450は主に CYP2C subfamily であるが、この subfamily に属するヒトP450 分子種としては CYP2C8, 9, 10, 18, 19 等が知られている。これらのうちのどの分子種がトルブタミドあるいは一連の非ステロイド性抗炎症薬の代謝に関与しているのか、最終的な結論はでていない。

一方、S-メフェニトインの代謝には遺伝的な多型性が存在し、ヒトにはS-メフェニトインの酸化的代謝能がほとんど欠如している個体(poor metabolizer, PM)と正常な個体(extensive metabolizer, EM)が存在する。S-メフェニトインの代謝に関与する P450 分子種も CYP2C subfamily に属しているが、先に述べた P450 分子種のうちの P450 がS-メフェニトイン酸化多型において主要な役割を果たしているか、CYP2C9 とする説と、CYP2C18 とする説等があり明確な結論は出されていないが、最近 CYP2C19 とする説が有力視されている⁴⁾。

これまでの in vitro 及び in vivo の検討から、S-メフェニトインの4'-水酸化に関与している P450 はトルブタミドの代謝に関与している P450 とは異なるとする説が有力であるが⁵⁾、用いる濃度域によっては同一の P450 分子種が関与するとの報告もある⁶⁾。

本研究では、ヒト肝ミクロソームと酵母に発現させたヒト P450 (CYP2C8, 9, 18, 19) を用い、メフェナム酸とジクロフェナックの代謝をトルブタミド及びS-メフェニトインの代謝と比較し、これらの薬物の代謝に関与するヒトP450分子種を推定した。

図1. Major metabolic pathway of mefenamic acid and diclofenac in humans.

【方法】 ヒト肝ミクロソームは、転移肝ガン切除標本の病理検査に供されない正常部分より常法に従い調製して得た。得られたミクロソームはR-及びS-メフェニトイン(1mM)の4'-水酸化活性を測定し、その比が0.4以上のものをS-メフェニトインのPMより得たミクロソーム、0.4以下のものをEMより得たミクロソームとした⁷⁾。今回使用したPMとEMのミクロソームでは、S-メフェニトインの4'-水酸化活性以外は、検討した総ての薬物代謝活性について差は認められなかった。

組み替えヒトP450 (CYP2C8, 9, 18, 19) は各P450のcDNAとシトクロムP450還元酵素の同時発現プラスミドを構築し、酵母に導入、発現させた後ミクロソーム画分を調製して使用した。

抗ヒトCYP2C抗体は、エーザイ、谷口、堀江博士より御供与頂いたものを使用した。なお本抗体はフェナセチンO-脱エチル化活性(CYP1A2)、デシプラミン2-水酸化活性(CYP2D6)、テストステロン6 β -水酸化活性(CYP3A)は阻害しなかった。

4'-水酸化ジクロフェナック、水酸化トルブタミド及び4'-水酸化メフェニトイン、の定量はHPLCにより行った。

【結果及び考察】 ヒト肝ミクロソームにおけるメフェナム酸の3'-水酸化活性、ジクロフェナックの4'-水酸化活性、トルブタミドの水酸化活性、及びS-メフェニトインの4'-水酸化活性のEadie-Hofstee Plots はいずれも検討した濃度範囲内では直線を示したことから一つの酵素またはKmの近い複数の酵素の関与が示唆された。一つの酵素が関係していることを仮定して得られた Kinetic parameter を表1に示した。

Table 1. Kinetic parameters of mefenamic acid 3'-hydroxylation, diclofenac 4'-hydroxylation, tolbutamide hydroxylation and S-mephenytoin 4'-hydroxylation activities in human liver microsomes

Drugs	n	Km(μ M)	Vmax(nmole/mg/min)	Vmax/Km(ml/mg/min)
Mefenamic acid	9	3.3 $\pm$ 0.7	0.74 $\pm$ 0.13	0.23 $\pm$ 0.05
Diclofenac	9	3.0 $\pm$ 0.7	2.6 $\pm$ 1.0	0.82 $\pm$ 0.24
Tolbutamide	9	52 $\pm$ 11	0.56 $\pm$ 0.22	0.011 $\pm$ 0.004
S-mephenytoin	9	22 $\pm$ 189	0.055 $\pm$ 0.026	0.0014 $\pm$ 0.0010

次に、抗ヒトCYP2C抗体の影響を検討した所、メフェナム酸の3'-水酸化、ジクロフェナックの4'-水酸化、トルブタミドの水酸化、S-メフェニトインの4'-水酸化、いずれも抗CYP2C抗体の添加により阻害され、2mg IgG/mg microsomesの添加では約90%阻害された(図2)。

しかし、PM と EM のミクロソームでKinetic parameterを比較したところ、PM におけるS-メフェニトインの水酸化のVmax/KmはEMの1/10以下であったのに対し、メフェナム酸の3'-水酸化活性、ジクロフェナックの4'-水酸化活性、トルブタミドの水酸化活性はいずれもPM, EM間で差は認められなかった。

次に、オメプラゾール、スルファフェナゾール、キニジン、ケトコナゾール添加の影響を検討した所、S-メフェニトインの4'-水酸化活性はオメプラゾール100 μ Mの添加により約90%阻害されたのに対し、メフェナム酸の3'-水酸化、ジクロフェナックの4'-水酸化、トルブタミドの水酸化は50%程度しか阻害されなかった。逆に、スルファフェナゾール50 μ Mの添加により、メフェナム酸の3'-水酸化、ジクロフェナックの4'-水酸化、及びトル

Figure 2. Effects of anti-CYP2C (●) and preimmune IgG (○) on 4'-hydroxylation of diclofenac, 3'-hydroxylation of mefenamic acid, 4'-hydroxylation of S-mephenytoin and hydroxylation of tolbutamide in human liver microsomes.

ブタミドの水酸化は90%以上阻害されたのに対し、S-メフェニトインの4'-水酸化はほとんど阻害されなかった。一方、CYP2D6の特異的阻害剤であるキニジンはメフェナム酸の3'-水酸化活性、ジクロフェナックの4'-水酸化活性、トルブタミドの水酸化活性、及びS-メフェニトインの4'-水酸化活性をほとんど阻害せず、CYP3A1に対して強い阻害作用を示すケトコナゾールも、上記活性を一部阻害したもののその程度は弱かった。

次に、12種の異なるヒト肝ミクロソームを用い、各P450分子種の活性とメフェナム酸の3'-水酸化活性、ジクロフェナックの4'-水酸化活性、トルブタミドの水酸化活性、及びS-メフェニトインの4'-水酸化活性の相関を求めたところ、メフェナム酸の3'-水酸化活性、ジクロフェナックの4'-水酸化活性、トルブタミドの水酸化活性は相互に高い相関を示したのに対し ($r=0.91-0.96$, $P<0.01$) (図3)、S-メフェニトインの4'-水酸化活性とは相関がないか、あっても弱い相関しか得られなかった ($r=0.59-0.68$, $P<0.01$)。また、メフェナム酸、ジクロフェナック、トルブタミドは相互の代謝を競合的に抑制し、その際得られた K_i 値はそれぞれの K_m 値に近い値を示した。

Figure 3. Relationships among diclofenac 4'-hydroxylation, mefenamic acid 3'-hydroxylation and tolbutamide hydroxylation activities in human liver microsomes.

最後に、酵母に発現させたCYP2C8, 9, 18, 19におけるメフェナム酸の3'-水酸化活性、ジクロフェナックの4'-水酸化活性を検討したところ、いずれの薬物についてもCYP2C9の活性が最も高く、CYP8及びCYP18の活性はCYP2C9の約1/10もしくはそれ以下であった(図4)。しかし、メフェナム酸に対するCYP2C19の代謝活性はかなり高く、CYP2C9の約70%であった(図4)。一方、ジクロフェナックの4'-水酸化におけるCYP2C19の活性はCYP2C9の約15%であった(図4)。なお、S-メフェニトインの水酸化活性はCYP2C19にのみ認められ、今回検討を行った他のCYP2C分子種には活性は認められなかった。

Figure 4. Comparison of mefenamic acid 3'-hydroxylation and diclofenac 4'-hydroxylation by CYP2C8,9,18 and 19.

以上の結果より、ヒト肝ミクロソームにおけるメフェナム酸の3'-水酸化、ジクロフェナックの4'-水酸化、トルブタミドの水酸化、及びS-メフェニトインの4'-水酸化は同じCYP2C subfamily に属する P450 によって行われるものの、前3者に関わるP450分子種と後者に関わるP450分子種は異なること、そして前3者には共通のP450分子種が関係していることが強く示唆された。また、ヒトP450発現系の結果から、前3者のうちジクロフェナックの4'-水酸化及びメフェナム酸の3'-水酸化に関与するヒトP450分子種はCYP2C9であり、メフェナム酸の場合については一部にCYP2C19が関与している可能性が示唆された。

【ABSTRACT】 Metabolism of mefenamic acid and diclofenac was studied using human liver microsomes and recombinant human P450 (CYP2C8,9,18 and 19) and compared with that of tolbutamide and S-mephenytoin. Anti-human CYP2C antibodies inhibited all the reactions mentioned above by upto 90% in human liver microsomes. However, the mean V_{max}/K_m values of diclofenac 4'-hydroxylation and mefenamic acid 3'-hydroxylation in the microsomes obtained from putative poor metabolizers of S-mephenytoin did not differ from those from extensive metabolizers. In addition, there were high correlations ($r=0.91-96, P<0.01$) among the activities of diclofenac 4'-hydroxylation, mefenamic acid 3'-hydroxylation and tolbutamide hydroxylation, whereas the correlation of these activities with S-mephenytoin 4'-hydroxylation capacity was insignificant or low. Among the CYP2C isoforms studied, CYP2C9 exhibited the highest activities in diclofenac 4'-hydroxylation and mefenamic acid 3'-hydroxylation, whereas CYP2C19 showed a comparable activity with CYP2C9 (70% of CYP2C9) for mefenamic acid. In conclusion, P450 isoform responsible for the metabolism of diclofenac, mefenamic acid and tolbutamide appears to be identical, whereas it seems to be different from that of S-mephenytoin. The study with recombinant P450 suggested that CYP2C9 is an isoform of P450 responsible for the 4'-hydroxylation of diclofenac and mefenamic acid, while CYP2C19 may also be involved in the metabolism of mefenamic acid in addition to CYP2C9.

【REFERENCES】

1. Newlands et al., Br. J. Clin. Pharmacol. 34:152, 1992.
2. Leemann et al., Clin. Pharmacol. Ther. 51:179, 1992.
3. Zhao et al., Life Sci. 51:575, 1992.
4. Goldstein et al., Biochemistry 33:1743, 1994.
5. Knodell et al., J. Pharmacol. Exper. Ther. 241:1112, 1987.
6. Chen et al., Pharmacogenetics 3:77, 1993.
7. Chiba et al., Drug Metab Dispos 21:747, 1993.