九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

内分泌毒性の種差のメカニズム検討 ： 抗喘息薬SMP-028のステロイド合成阻害に起因する内分泌毒性の種差

西里，洋平

https://hdl.handle.net/2324/1500447

出版情報：九州大学，2014，博士（薬学），論文博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

内分泌毒性の種差のメカニズム検討
-抗喘息薬 SMP-028 のステロイド合成阻害に起因する内分泌毒性の種差-

西里　洋平

【序論】

内分泌臓器および生殖器におけるステロイド合成系は、生体内のホルモン恒常性に重要である。そして、これらの内分泌関連臓器におけるステロイド合成系の阻害は、内分泌毒性を惹起する可能性があると考えられる。一方で、医薬品開発における Translational research (TR) の一つに、ヒトにおける薬理作用および安全性を予測するための研究がある。特に非臨床試験から臨床試験への TR として、臨床試験開始から承認申請の間に規制当局より要求される一連の安全性試験がある (Matters and Walker, 2009)。したがって、医薬品開発においては、ヒトで内分泌毒性を回避するために非臨床の安全性試験にて内分泌毒性が十分に評価された上で、ヒトでの安全性が確保されていることが重要である。しかしながら、内分泌毒性に関しては、非臨床の安全性試験で用いられる動物とヒトでは、化合物に対する生体の反応性に種差があることが知られている (Habert et al., 2014; Inomata, 2008)。したがって、内分泌毒性に関しては、安全性試験においてげっ歯類および非げっ歯類の 2 種で検討し、かつ必要に応じてヒトを視野にいれた種差のメカニズム検討を実施する必要がある。

SMP-028 は、抗喘息薬として開発が目指された化合物である。げっ歯類のラットおよび非げっ歯類のサルを用いた 13 週間の反復投与毒性試験において SMP-028 を評価した結果、内分泌毒性の種差が認められた。ラットでは、内分泌関連臓器である副腎や精巣、卵巣、前立腺、精嚢、子宮での病理学的変化が検出された。具体的には、SMP-028 を経口投与した雄性ラットおよび雌性ラットの副腎においては、皮質細胞の空砲化と脂質滴の蓄積を伴う副腎重量の増加が認められた。また、雄性ラットにおいては、精巣重量の増加と前立腺および精嚢の重量低下が認められた。さらに、雌性ラットにおいては、卵巣重量の増加と子宮の委縮が認められた。一方、サルでは、内分泌関連臓器に毒性は認められなかった。

SMP-028 をラットに投与した際に認められた毒性と同様の毒性をラットで引き起こす化合物としては、ketoconazole (Nishikawa et al., 1984; Shin et al., 2006) もしくは triaryl phosphates (Latendresse, et al., 1993, 1994) が過去に報告されている。そして、両化合物ともステロイド合成酵素を阻害することが知られている (Kan et al., 1985; Latendresse, et al., 1993)。したがって、SMP-028 と同様の内分泌毒性が惹起される場合、一つの原因としてステロイド合成系の阻害が関与している可能性が考えられる。しかしながら、SMP-028 については、ラット *in vivo* 内分泌臓器においてステロイド合成系を阻害するかどうかは不明である。

そこで本研究の目的は、SMP-028 の内分泌毒性の種差を契機とし、内分泌毒性の種差のメカニズムの一因を解明することである。あわせて、内分泌毒性の種差を理解する観点で、SMP-028 がヒトで内分泌毒性を惹起するかに関する検討も行うこととした。そのために、初めに SMP-028 のラット内分泌臓器におけるステロイド合成系への影響を検討した。続いて、ラットステロイド合成酵素への影響を検討した。さらに、サルステロイド合成酵素およびヒトステロイド合成酵素への SMP-028 の影響も合わせて検討した。

【方法】

1. SMP-028 のラットステロイド合成系への影響

ラット副腎および精巣、卵巣より調製した初代培養細胞に SMP-028 を添加し、培養上清中のステロイドホルモン（progesterone および aldosterone、corticosterone、total testosterone、estradiol）を radioimmunoassay 法にて測定して SMP-028 の影響を検討した。

2. SMP-028 のラットステロイド合成酵素への影響

速度論的に最適化した阻害評価系を以下に示す手順にて構築した。まず、ステロイド基質と生成物の分離定量が可能な RI-HPLC の条件を確立した。次に、ステロイド合成酵素の活性が評価可能なステロイド基質と酵素源の最適な組み合わせを設定した。その後、反応時間の直線性および Michaelis-Menten 型の反応を確認し、各ステロイド合成酵素の K_m を算出した。

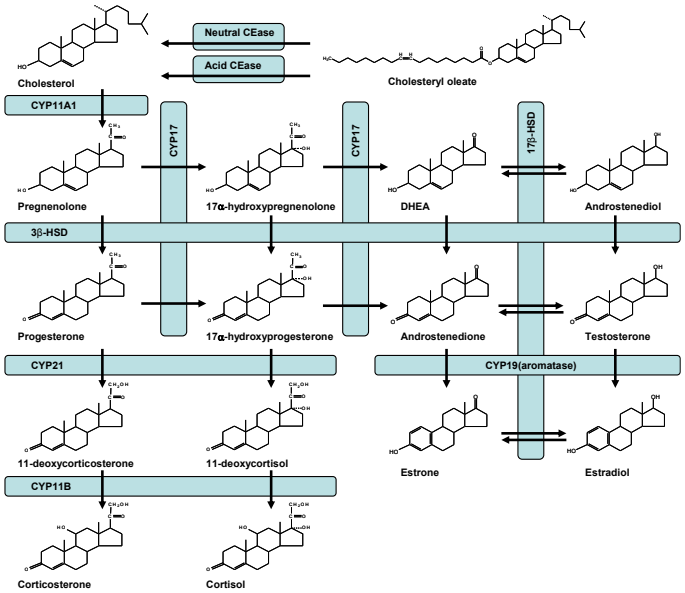

Fig. 1. Enzyme-based steroidogenesis pathway.

その後、12 種類のラットステロイド合成酵素（acid cholesterol esterase（CEase）および neutral CEase、CYP11A、3β-hydroxysteroid dehydrogenase（HSD）、CYP21、CYP11B、CYP17、CYP19、17β-HSD for conversion from androstenedione to testosterone (A to T)、17β-HSD for conversion from testosterone to androstenedione (T to A)、17β-HSD for conversion from estrone to estradiol (E1 to E2)、17β-HSD for conversion from estradiol to estrone (E2 to E1)）に対する SMP-028 の影響を検討した（Fig. 1）。

3. SMP-028 のサルとヒトの acid CEase および neutral CEase への影響

サル acid CEase およびサル neutral CEase の阻害評価系はサル精巣から調製した酵素源を用いて、ヒト acid CEase およびヒト neutral CEase の阻害評価系はヒト acid CEase およびヒト neutral CEase を発現させた細胞から調製した酵素源を用いて、上述の手順により構築した。構築した阻害評価系を用いて、SMP-028 のサルとヒトの acid CEase および neutral CEase への影響を検討した。

【結果】

1. SMP-028 のラットステロイド合成系への影響

SMP-028 は、雌雄副腎細胞および精巣細胞、卵巣細胞の培養上清中の progesterone を減少させた。あわせて、精巣細胞培養上清中の total testosterone を用量依存的に減少させた。卵巣細胞培養上清中 estradiol も減少させた。

2. SMP-028 のラットステロイド合成酵素への影響

SMP-028 は、濃度依存的に neutral CEase を強く阻害し、その IC_{50} は 1.01 μM であった（Fig. 2）。

一方で、SMP-028 は、他のステロイド合成酵素への阻害作用は弱く、IC_{50} は 10 μM 以上であった。特に、SMP-028 は、acid CEase への阻害作用は示さなかった（IC_{50} >100 μM）。

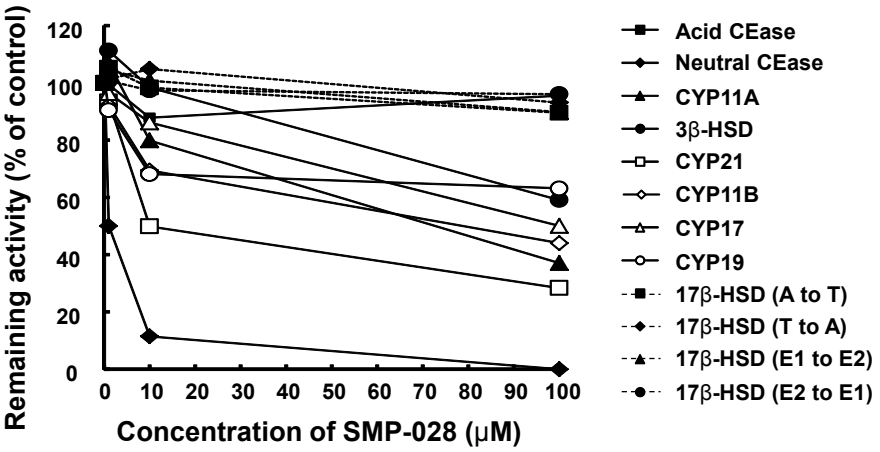

Fig. 2. Effects of SMP-028 on steroidogenic enzymes in rat.

3. SMP-028 のサルとヒトの acid CEase および neutral CEase への影響

SMP-028 は、サル neutral CEase をラット neutral CEase に比べ弱く阻害し、その IC_{50} は 31.1 μM であった。また、ヒト neutral CEase への阻害作用もラット neutral CEase に比べ弱く、その IC_{50} は 33.8 μM であった。サルおよびヒトの neutral CEase に対する IC_{50} は、ラット neutral CEase に対する IC_{50} の約 30 倍であった。一方、サルおよびヒトの acid CEase への阻害作用は認められなかった（IC_{50} >100 μM）。

【考察】

本研究において、SMP-028 は、ラット雄副腎細胞および雌副腎細胞、精巣細胞、卵巣細胞のステロイド合成系に対し 各種ステロイドホルモンの前駆体である progesterone を減少させた。本研究で得られた SMP-028 の IC_{50} とラットに SMP-028 を 13 週間経口投与した際に得られる最終投与後の $C_{max,\ free}$ の比較を行い、$C_{max,\ free}$ が得られた IC_{50} より高い濃度であることが明らかとなった。したがって、SMP-028 はラット *in vivo* 内分泌臓器においてステロイド合成系を阻害していると考えられ、ラット *in vivo* ステロイド合成系を阻害することによりラット内分泌毒性が惹起されたと結論付けた。

続いて、ラットステロイド合成酵素に着目し、ラットステロイド合成酵素阻害評価系を構築したのち、SMP-028 の当該酵素への影響について検討を行い、SMP-028 が neutral CEase を阻害することを明らかにした。Neutral CEase は一般的にステロイド合成系における progesterone の生成に強く関与していることが知られていることから (Fig. 1)、本結果は上述した初代培養細胞の結果と矛盾しない。初代培養細胞と同様に SMP-028 の $C_{max,\ free}$ を考慮し、SMP-028 はラット *in vivo* 内分泌臓器において neutral CEase を阻害すると考えられた。ラットにおいてステロイド合成系への cholesterol の主な供給経路 (Fig. 3) を考慮すると、SMP-028 が neutral CEase を阻害することにより、ラット *in vivo* ステロイド合成系における cholesterol の重篤な不足を引き起こし、その結果、ラットの内分泌毒性が引き起こされたと結論付けた。

次に、サルにおいては、SMP-028 のサル neutral CEase に対する阻害作用がラット neutral CEase に対する阻害作用の約 1/30 であることを明らかにした。SMP-028 をサルに 13 週間経口投与した後の $C_{max, free}$ を考慮すると、SMP-028 はサル *in vivo* において neutral CEase を阻害しないと考えられた。さらに、サルステロイド合成系への cholesterol の供給に着目すれば、サルステロイド合成系に対しては acid CEase への阻害の影響が大きいと考えられるが (Fig. 3)、本研究においてサル acid CEase に対して阻害は認められていない。したがって、SMP-028 はサル *in vivo* ステロイド合成系を阻害せず、サル *in vivo* では内分泌毒性が認められなかったと結論付けた。

最後に、ヒトでもサルと同様にヒト neutral CEase への阻害がラット neutral CEase より弱いことおよびヒトステロイド合成系への cholesterol の供給に対する neutral CEase の寄与がサルと同等であることから (Fig. 3)、SMP-028 をヒトに経口投与した際の $C_{max, free}$ がヒト neutral CEase に対する SMP-028 の IC_{50} を超えないかぎり、サルと同様にヒト *in vivo* においても内分泌毒性が惹起されないと結論付けた。本研究は、内分泌毒性の種差を解明する上で有益な知見となったと考えられる。

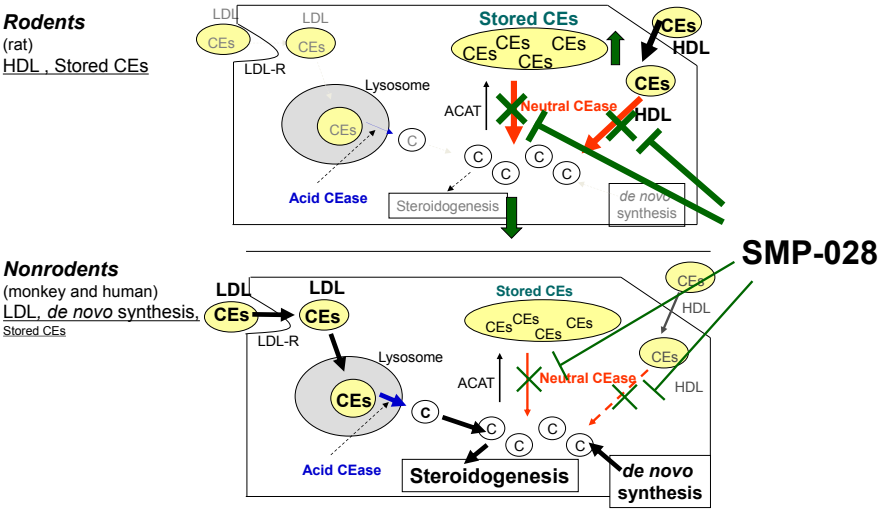

Fig. 3. Species differences of inhibition of steroidogenesis pathway by SMP-028 between rodents (rat) and nonrodents (monkey and human). LDL, low density lipoprotein; LDL-R, LDL receptors; HDL, high density lipoprotein; C, cholesterol; CEase, cholesterol esterase; CEs, cholesterol esters; ACAT, acyl-coenzyme A: cholesterol O-acyltransferase.

【引用文献】

Habert, R. *et al.*, 2014. ***Reproduction.*** 147, R119-R129; Inomata A., 2008. ***Folia. Pharmacol. Jpn.*** 132, 297-300; Kan, P.B. *et al.*, 1985. ***J. Steroid Biochem.*** 23, 1023-1029; Latendresse, J.R. *et al.*, 1993. ***Toxicol. Appl. Pharmacol.*** 122, 281-289; Latendresse, J.R. *et al.*, 1994. ***Toxicol. Pathol.*** 22, 341-352; Matter, W.B., Walker, E.G., 2009. ***Clin. Pharmacol. Ther.*** 85, 327-330. Nishikawa, S., *et al.*, 1984. ***Kiso to Rinsho.*** 18, 1401-1425; Shin, J.H., *et al.*, 2006. ***Arch. Toxicol.*** 80, 797-803.

【発表論文】

(1) Nishizato, Y. *et al.*, 2010. ***Toxicol. In Vitro.*** 24, 677-685.

(2) Nishizato, Y. *et al.*, 2014. ***Toxicol. In Vitro.*** 28, 397-402.

(3) Nishizato, Y. *et al.*, 2014. ***Toxicol. Appl. Pharmacol.*** 276, 213-219.