

令和 4 年 12 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15148

研究課題名(和文) フェノバルビタール型薬物代謝酵素誘導機構の新規仮説：モデルとメカニズム検証

研究課題名(英文) Novel hypothesis for phenobarbital induction of drug metabolizing enzyme: Investigation of a model and a mechanism

研究代表者

石井 祐次 (ISHII, YUJI)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：90253468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：新たなフェノバルビタール型薬物代謝酵素誘導機構の仮説の検証を目指し、Crisper-Cas9法を用いて、シトクロムP450 3A欠損細胞の作成を試み、HepG2細胞の片方のアレルの欠損(ヘテロ欠損)細胞を得た。また、本研究を遂行するに当たって、必要となったマウス肝臓の全てのUDP-グルクロン酸転移酵素(Ugt)分子種の包括的解析を行うことにより、モルヒネおよびアセトアミノフェン代謝の責任酵素を明らかにした。さらに、フェノバルビタール処理マウスにおける血液および肝臓のメタボローム変動についての検討も行った。これら変動した物質の中に、当初仮説の条件に合致するものがあると考え、検討を続けている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

古くから知られている薬物代謝酵素の誘導現象について新たな仮説を検証しようと試みた挑戦的研究である。得られた成果には更なる発展が期待される。また、その途上に、医薬品開発に汎用されるマウスの主要薬物代謝酵素UDP-グルクロン酸転移酵素の包括的特性評価系を確立した。これは、医薬品開発における前臨床試験の精度の向上に資する研究であると期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated a model and a mechanism that the novel hypothesis for phenobarbital (PB) induction of drug metabolizing enzymes. In this study, we made attempt to establish cytochrome P450 3A (CYP3A)-null HepG2 cells. So that we obtained CYP3A-hetero-knockout cells. In addition, we established the expression system for all the UDP-glucuronosyltransferase (Ugt) isoforms in mouse liver. We carried out comprehensive analysis for the Ugt isoforms and found Ugt isoforms predominantly participated in morphine and acetaminophen glucuronidation, respectively. Further, we carried out metabolomic analysis of PB-treated mice. There are marked difference in metabolome on the basis of OPLS-plot and S-plot. Some metabolites including steroids are found to be altered by PB. Further studies are necessary to elucidate the novel hypothesis of PB-induction.

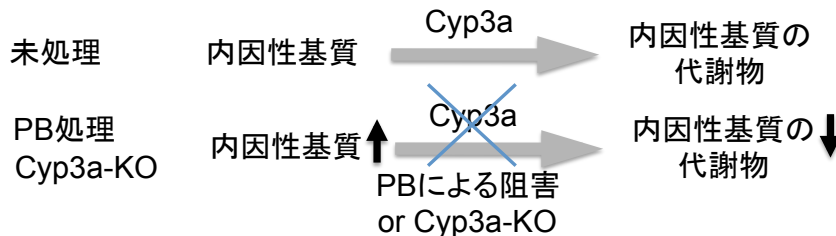
研究分野：衛生薬学、薬物代謝

キーワード：シトクロムP450 UDP-グルクロン酸転移酵素 フェノバルビタール

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筆者らは、シトクロム P450 3a (Cyp3a) の欠損によりフェノバルビタール (PB) 型酵素誘導と同じ現象が現れるとする作業仮説を立てた。Cyp3a-ノックアウト (KO) および Cyp3a-KO-CYP3A4-ノックイン (KI) マウスをモデル動物とする。PB により Cyp3a の機能が著しく阻害された状態は、Cyp3a 遺伝子が KO された状態と近似していると考えられ、Cyp3a-KO 動物は上述の仮説を検証するために極めて有効と考えられる。そこで、本研究では、このモデル動物を利用して、PB 型酵素誘導の新規仮説を検証し、PB 誘導に関与する内因性低分子化合物を同定することを目指す。Cyp3a の欠損が PB 処理と同じ働きをなすのは何故か? それには、当研究室で提唱されてきた仮説を基に考えると説明できる (図 1)。



仮説1: 内因性基質 (CAR内因性リガンド?)の蓄積による遺伝子発現活性化
仮説2: 内因性基質の代謝物 (遺伝子発現抑制物質)の低下による発現抑制の解除

図1. フェノバルビタール (PB) 型薬物代謝酵素誘導の新規機構 (仮説)
(Yamada, H. et al, Curr. Drug Metab., 2006)

すなわち、PBは、Cyp3aのような構成的に発現しているP450を強く阻害し、そのP450の内因性の基質を増加、ないしは代謝物の量を減少させることを通じて、酵素誘導を引き起こすというものである。Cyp3a KOマウスに引き起こされた現象についても、二つの仮説が導きだされる。(仮説1)「Cyp3aの内因性基質がPB型誘導のキープレイヤーであり、Cyp3aは普段はこれを代謝しているからPB型誘導が起こらない。しかし、Cyp3aが欠損すると、この内因性基質のレベルが上昇し、PB型誘導が起こる。」;(仮説2)「Cyp3aの内因性基質の代謝物にPB型誘導の抑制作用があり、Cyp3aが欠損するとその抑制作用がなくなるため、PB型誘導が起こる。」というものである。いずれにしても、Cyp3a-KOマウスでは、Cyp3aの内因性基質が増えているはずである。そこで、本研究では、野生型マウス、Cyp3a-KOマウスおよびCyp3a-KO-CYP3A4-KIマウスの肝臓、血液および脳をメタボロミクス解析し、Cyp3a-KOで増加して、CYP3A4-KIで元に戻ることを指標にして、Cyp3aの内因性基質の候補を探索する。この候補化合物の血中濃度はPB型薬物代謝酵素誘導能のバイオマーカーになる可能性がある。また、CYP3A4機能の制御は、活性酸素の生成とガン形成に密接に関係すると考えられることから、この化合物は医薬品のシーズになる。薬物・環境化学物質に対する生体応答とその機構の解明は、毒性学的にも重要であり、暴露へのバイオマーカーとしての活用も期待され、創薬と環境科学への貢献が期待される。

薬物代謝酵素の誘導、特に、多環芳香族炭化水素による誘導とPBによる誘導は、薬物代謝研究の黎明期より盛んに研究されてきた。前者は、応答性の異なるマウスの存在や、誘導に関与する転写調節因子、芳香族炭化水素受容体 (Ah-receptor; AhR) の同定がなされ、これが結合する遺伝子上の配列、ヘテロオリゴマーパートナー Arnt も明らかにされ、ノックアウトマウスの作製などにより、ほぼ全貌が明らかにされたと言っても過言ではない。一方、PB誘導については、Negishiらの研究により、転写因子 constitutive androstan receptor (CAR) が関与すること、CARのヘテロオリゴマーパートナーが retinoid-X-receptor (RXR) であり、CAR/RXRヘテロオリゴマーが誘導する遺伝子上に存在する phonobarbital responsive enhancer module (PBREM) に結合することによることが明らかにされた。PBREMは、CYP2BやUGT1A1上に存在することが分かっている。CARの合成リガンドとしてPOBOPが知られている一方、PBはCARのリガンドにならないことも分かっている。誘導におけるPBの作用点は全く分かっていなかったが、最近、Negishiらの研究により、PBがEGF受容体のシグナルを弱めることで間接的にCARを活性化すると報告された。この論文では、複雑なタンパク質リン酸化の変動により、PB誘導が制御されていることが示唆された (Mutoh et al, Sci Signaling, 6, ra31, 2013)。これは有力な仮説である一方、EGF受容体をPB受容体と考えるには、結合に高濃度が必要であること、構造的に多様なPB様誘導剤すべてに適用できるのかなど、まだ検証すべき点が残されている。申請者らの研究の着眼点は、この研究とは一線を画す。PBの作用点について、当研究室では新規仮説を提唱して来た (Yamada et al, Curr Drug Metab, 7, 397, 2006)。すなわち、PB誘導は、PBそのものが誘導剤のではなく、1) PBによって代謝が阻害されて残存量が増えたP450の内因性基質が真の誘導剤である。2) あるいは、内因性基質の代謝により生じた代謝物が抑制剤であり、PBによって内因性基質の代謝が抑制され、代謝物が減少することにより抑制が解除され、誘導が見られるという仮説である (図1参照)。この2つの仮説の検証は難しかった。しかし、近年、メタボロミクス解析技術が発展した。加えて、筆者らは、極く最近、Cyp3a-KOマウスに、PB誘導とほぼ同じことが起きていることを示唆する結果を得た。本研究では、これらの

情報を統合することにより、PB 誘導におけるキープレイヤーである内因性低分子化合物を同定して PB 誘導の新規機構に迫ろうとするものである。

2. 研究の目的

「フェノバルビタール (PB)型薬物代謝酵素誘導機構の新規仮説：モデルとメカニズム検証」に取り組む。本研究では、古くから知られている PB 型の薬物代謝酵素誘導において未解明であった PB の作用点が、常在型シトクロム P450 の CYP3A であることを明らかにする。PB による CYP3A の著しい阻害により PB 型誘導が引き起されるメカニズムを、Cyp3a-ノックアウト (KO)および、CYP3A4 を KI したマウスを用いて明らかにする。PB 誘導現象は、「PB によって阻害されることにより CYP3A の内因性基質が蓄積、あるいは内因性物質の代謝物量が著しく低下することにより引き起される。」とする新規仮説からモデルを構築し、Cyp3a-KO で増加し、CYP3A4-KI で正常レベルに戻る内因性物質をメタボロミクス解析して同定、このメカニズムを検証する。

3. 研究の方法

本研究における動物実験は、九州大学動物実験委員会の承認を受けて行った。また、遺伝子組換え実験は、九州大学遺伝子組換え委員会の承認を受けて行った。

マウス肝臓の全 Ugt 分子種の発現系の構築：本実験の基本的な内容は、Kurita et al (2017)(業績欄参照)に記載の通りである。7 週齢雄性 FVB マウスは、日本クレアより購入し、肝臓を摘出して RNeasy Isolation kit (キアゲン)を用いて total RNA を得た。これをオリゴ dT をプライマーとして PrimeScript™ reverse transcriptase により逆転写を行い、分子種特異的なプライマーペアを用い、Pfu-Turbo DNA-polymerase を用いて nested PCR を行い、pFastBac1 にサブクローニングした。得られたプラスミドは、適宜 BigDye terminator cycle sequencing kit ver3.1 を用いて反応させ、正しい塩基配列であることを確認した。DNA シークエンス解析は、九州大学医学研究院研究・教育支援センターにて受託解析した。配列を確認した各 Ugt 分子種は、Bac-to-bac 法により、組換えバクミドを得て、Sf9 細胞にトランスフェクトし、組換えバキュロウイルスを得た。ウイルスは適宜増幅して、Sf9 細胞に感染させ、40 時間後に細胞を回収してマイクロゾームを調製した。

タンパク質の定量：タンパク質は、牛血清アルブミンを標準タンパク質として Lowry らの方法 (Lowry et al, J Biol Chem, 193, 265, 1951)に従って定量した。

酵素活性の測定：モルヒネ、4-methylumbelliferone、クロラムフェニコール、17-beta-estradiol (3 位および 17 位)、acetaminophen に対するグルクロン酸抱合活性は、当研究室で確立した方法に従った。酵素源を適切な緩衝液中で、基質および 2 mM UDP-グルクロン酸の存在下 37°C でインキュベーションし、生成したグルクロニドを蛍光および紫外部検出器を装着した工機製の HITACHI Chromaster HPLC を用いて、絶対検量線法にて定量した。

CYP3A 欠損 HepG2 細胞の構築：ヒトの CYP3A のうち、CYP3A4-CYP3A7-CYP3A5 を同時に欠損させることを目指し、ガイド RNA をデザインし、Crisper-Cas9 法により HepG2 細胞での遺伝子編集を行った。プラスミド pSpCas9 (BB)-2A-Puro は、Feng Zhang 博士の研究室から Addgene (addgene pX459)を介して入手したものである。CYP3A4, CYP3A7, CYP3A5 の 7 番染色体欠失を大規模に作成するガイド RNA 用オリゴヌクレオチドは、日高京子教授 (北九州市立大学) の協力を得て CRISPR Design tool (<http://crispr.mit.edu>) または Benchling (<http://benchling.com>) で設計した。ガイド RNA のオリゴヌクレオチドの配列は以下の通り。
CYP3A4_gRNA_F; 5'-caccGTCTTTGCTGGGCTATGTGCA-3'
CYP3A4_gRNA_R; 5'-aaacTGCACATAGCCCAGCAAAGAC-3'.
CYP3A5_gRNA_F; 5'-caccGTCAAGAGATGGAACCCTAAG-3'.
CYP3A5_gRNA_R; 5'-aaacCTTAGGGTTCCATCTTGAC-3'
スクリーニングして得られた陽性細胞は、ゲノム DNA に対する特異的な制限酵素処理により CYP3A allele の欠損の有無を判別し、DNA シークエンシングにより検証した。

PB 処理マウスにおけるメタボロミクス解析：7 週齢雄性 FVB マウスに、PB-Na を 40 mg/kg (i.p.)4 日間投与し、最終投与 1 日後に肝臓を摘出し、使用まで -80°C にて保存した。また、血液を採取し、定法に従って血清を調製し、解析まで -80°C フリーザーに保存した。既報 (Li et al, Drug Metab Pharmacokinet, 32, 108, 2017)に従って、肝臓に水/MeOH(1:1, v/v)添加によりサンプル調製を行い、フィルター濾過後に BEH C18 column (2.1 x 100 mm, 1.7 mm i.d.; Waters) を装着した UPLC-TOF/MS (LCT-Primer XE; Waters)に付してメタボロミクス解析を行った。血清/アセトニトリル(1:3, v/v)で血清を希釈し、13,000 rpm、4°C、10 min 遠心し、上清 100 μL を LC-MS 解析に供した。メタボロミクスの条件は、基本的に研究代表者の既報に準じて行った。メタボロームが乖離しているか否かは、主成分分析によって確認し、解析ソフトウェア Masslynks を用いて human metabolome database と照合し、S-plot により相関係数-0.7 および +0.7 を閾値として有意な変動成分を見出した。

4. 研究成果

1. マウス肝臓の全 Ugt 分子種の発現系の構築

本研究では、基礎的検討として、マウス肝臓の全 Ugt 分子種の発現系を構築した。これは、本研究の目的に資するものであるとともに、これ自体の新規性が高い。マウスを用いた検討が創薬における前臨床研究において重要な位置付けにあることから、この発現系を用いた解析の成果は、社会的貢献が大きいと考えられる。本研究では、汎用性の高い基質について包括的特性評価を実施し、モルヒネ、4-methylumbelliferone、クロラムフェニコール、17 β -estradiol (3位および17位)、acetaminophen に対するグルクロン酸抱合活性により、それぞれの分子種の特徴づけを行った。医療麻薬モルヒネの抱合に関与する主要な分子種は、Ugt2b36 であることが明らかになった。エストラジオールの3位抱合活性と17位抱合活性については、前者は Ugt1a1 が主な分子種であり、後者は Ugt2b1 および Ugt2b5 が主要な分子種であった。クロラムフェニコールの抱合活性については、エストラジオール17位の抱合活性と類似のプロフィールを示した。これらについては、既に国際学術雑誌に報告したため、それを参照しデータの掲載は割愛する (Kurita et al, J Pharmacol Exp Ther, 361, 199, 2017)。また、イリノテカンの活性代謝物である SN-38 の抱合に関しては、Ugt1a1 が主要分子種であることが明らかだった (図. 2)。解熱鎮痛剤として汎用され、自殺企図での高用量摂取も問題になっている acetaminophen については、Ugt2b34 が主要分子種であった。これに比べ低いものの、Ugt1a1 にも活性が認められた。マウスは、様々な疾患のモデル動物としても用いられており、Ugt の発現調節なども研究対象となってきた。しかし、これまで、マウスの Ugt 分子種の機能が包括的に検討された例はなく、本研究の提示する内容は重要だと考えられる。Ugt1a1 が SN-38 の抱合に関与する事実は、ヒトの分子種との機能的対応関係 functional counterpart を意味する。モルヒネおよび acetaminophen の抱合には、ヒトではそれぞれ UGT2B7 および UGT2B15 が主に関与するが、マウスにおける functional counterpart は、この研究により、それぞれ Ugt2b36 および Ugt2b34 であることが明らかになった。これらは、本研究での特筆すべき成果である。

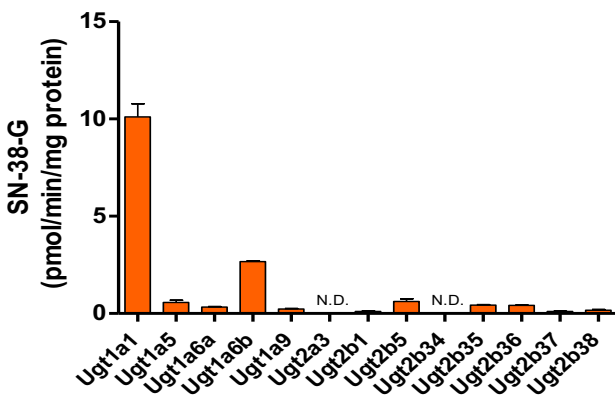


図 2 Specificity of each mouse Ugt isoform toward a representative substrate SN-38 was used as a substrate. The glucuronide was measured by HPLC. Each bar represents the mean \pm S.D. of triplicate assay. Sf9 microsomes expressing each Ugt isoform were used.

2. CYP3A 欠損 HepG2 細胞の構築

供給業者の状況と配分予定研究費の総額との関係から、当初予定の遺伝子改変動物の入手が不可能になったため、代替法として実施した。ヒトの CYP3A のうち、CYP3A4-CYP3A7-CYP3A5 を同時に欠損させることを目指した。スクリーニングによって陽性が得られ、限界希釈によって、クローンを得た。ゲノム DNA を制限酵素マッピングにより調べたところ、CYP3A 遺伝子の欠損によって得られると期待される断片が観察された。また、同時に、野生型遺伝子に由来する断片も観察された。欠損部分については、クローン化後にシーケンシングを行い large deletion を確認した。もう一方の allele には欠損は認められなかった。HepG2 細胞には、少なくとも 2 セットの染色体があると考えられ、片方の allele のみが欠損した hetero 欠損細胞を得たものと考えられた。本研究は、CYP3A の全欠損による影響を調べることを目的としているため、CYP3A 全欠損の細胞を得るために継続してスクリーニングを行ったが、本研究の助成期間には陽性クローンを得るに至らなかった。欠損細胞を得にくかった理由としては、large deletion を目指したことが一因と考えられる。一分子種ずつ、遺伝子編集による欠損を積み重ねることも今後検討を行う必要がある。

3. PB 処理マウスにおけるメタボロミクス解析：当初仮説に従えば、PB 処理によって CYP3A による代謝が抑制され増加するものがあると推定される。そこで、肝臓 (図 3) と血液 (図 4) のメタボロミクス解析を行った。主成分解析の結果、これらのメタボロームには乖離が認められた。変動した物質の中に、当初仮説の条件に合致するものがあると考え、検討を続けている。これら

の中には、ステロイドやその代謝物も含まれており、それぞれの性質については、今後、詳細な検討を要する。

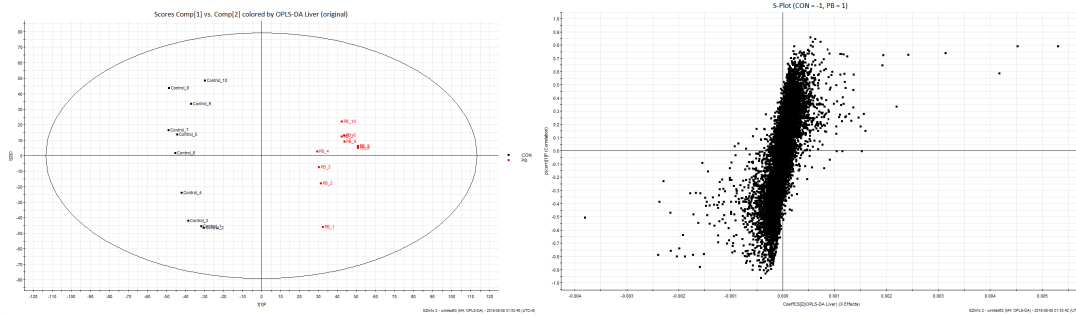


図3 肝臓のメタボロミクスの結果：OPLS-DA plot (左)および S-plot (右)
左 (Control vs PB), n=10

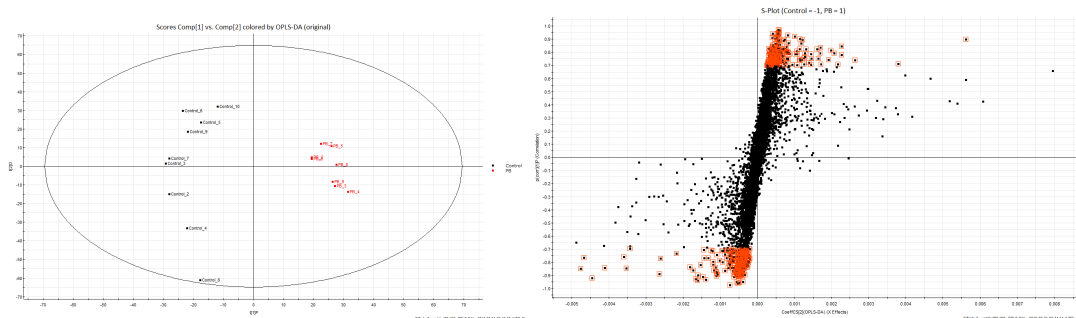


図4 血液のメタボロミクスの結果：OPLS-DA plot (左)および S-plot (右)
左 (Control vs PB), n=10; 右, 相関係数-0.7 および+0.7 を閾値とした時の変動成分 (赤)

本研究では、PB 誘導の新規機構について仮説の検証をすることを目指し、マウスをモデルとして、まず Ugt の発現系を構築した。また、CYP3A 欠損による影響を調べるため、CYP3A 欠損 HepG2 細胞の作製を行い、ヘテロ欠損細胞を得た。さらに、PB 処理によるメタボローム変動についても見出し、ステロイドやその代謝物の中に、所期の目的に合致した成分が含まれている可能性が考えられた。今後、Cyp3a 欠損動物を用いた研究により、更なる検証を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

1. Kurita A, Miyauchi Y, Ikushiro S, Mackenzie PI, Yamada H, Ishii Y, Comprehensive Characterization of Mouse UDP-Glucuronosyltransferase (Ugt) Belonging to the Ugt2b Subfamily: Identification of Ugt2b36 as the Predominant Isoform Involved in Morphine Glucuronidation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 361: 199-208 (2017)

〔学会発表〕 (計 4 件)

(国内学会)

1. Ayumi Kurita, Yuu Miyauchi, Peter I. Mackenzie, Hideyuki Yamada, Yuji Ishii, Comprehensive characterization of mouse hepatic UDP-glucuronosyltransferases belonging to 2B subfamily: major participation of Ugt2b36 in morphine and diclofenac glucuronidation. 日本薬物動態学会第 31 年会, 2016 年 10 月 (松本)
2. 栗田歩実, 宮内優, Mackenzie, P.I., 山田英之, 石井祐次, マウス肝の全 UDP-グルクロン酸転移酵素分子種の包括的特性評価. 第 33 回日本薬学会九州支部大会, 2016 年 12 月 (鹿児島)
3. Ryohei Yamashita, Ayumi Kurita, Yuu Miyauchi, Shin'ichi Ikushiro, Peter I. Mackenzie, Yuji Ishii, Comprehensive characterization of mouse hepatic UDP-glucuronosyltransferases: major participation of Ugt1a1 in SN-38 glucuronidation. 日本薬物動態学会第 32 年会, 2017 年 11 月 (東京)

(国際学会)

1. Ryohei Yamashita, Ayumi Kurita, Yuu Miyauchi, Shinichi Ikushiro, Peter I Mackenzie, Yoshitaka Tanaka, Yuji Ishii, Comprehensive characterization of mouse hepatic UDP-glucuronosyltransferases: Major participation of Ugt2b34 in acetaminophen

glucuronidation. 2018 International Meeting on 22nd MDO (The International symposium on microsomes and Drug Oxidations) and 33rd JSSX (The Japanese Society of Study for Xenobiotics), 2018年10月(金沢)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：宮内 優

ローマ字氏名：Miyuchi Yuu

研究協力者氏名：日高 京子

ローマ字氏名：Hidaka Kyoko

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。