

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07082

研究課題名(和文)AADACの毒性学および病理学的意義の解明

研究課題名(英文)Toxicological and physiological significance of AADAC

研究代表者

深見 達基 (Fukami, Tatsuki)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：00532300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓や小腸に発現するアリルアセタミドデアセチラーゼ(AADAC)は構造内にエステルおよびアミド結合を有し、カルボン酸側がアセチル基である化合物を好んで加水分解する。本研究では、AADACがアセチル基を有する医薬品を特異的に触媒することをさらに明らかにするとともに、N-アセチルトランスフェラーゼ(NAT)によって生成する一部のアセチル代謝物も加水分解することによりNATに対して拮抗的な役割を果たすことも明らかにした。また、AADACの発現量を増減させた細胞やAadac遺伝子を欠損させたマウスを用いることにより、AADACは生理学的役割として脂質蓄積を抑制する機能を有することも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床で使用されている医薬品の約10%は加水分解されることで薬効を失ったり、獲得したりするだけでなく、毒性を発揮する原因物質が生成される場合もある。医薬品の多くはカルボキシルエステラーゼにより加水分解されるとされてきたが、近年開発された医薬品ではアリルアセタミドデアセチラーゼ(AADAC)により加水分解されるものも散見される。AADACの基質認識性や薬物動態に与える影響の解明は医薬品の開発および適正使用にて重要な情報源となる。また、AADACが脂質代謝に関与することも初めて実験的に明らかにした。現在、生活習慣病の罹患者が増えていることから、AADACの機能解明は大きな意味を持つ。

研究成果の概要(英文)：Arylacetamide deacetylase (AADAC) has been recognized as a drug-hydrolyzing enzyme. In this study, the preference of human AADAC for the hydrolysis of drugs containing acetyl group was clarified using eslicarbazepine acetate and abiraterone acetate. In addition, the acetylated metabolites of some N-acetyltransferase (NAT) substrates were hydrolyzed by AADAC. In fact, when nitrazepam was orally treated, the plasma concentration of N-acetylamino nitrazepam, which is produced by NAT, in Aadac knockout mice was higher than that in wild-type mice. In addition to drug metabolism, AADAC is likely involved in the metabolism of endogenous compounds. When fatty acids were treated with cells, in where AADAC is overexpressed or knocked down, intracellular lipid accumulation was attenuated or increased, respectively. In treatment of high fat diet, Aadac knockout mice showed the higher plasma lipids including cholesterol than wild-type mice. Thus, AADAC would be involved in the lipid homeostasis.

研究分野：薬物代謝学、毒性学

キーワード：薬物代謝 脂質代謝 加水分解

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臨床で使用されている医薬品の約10%は加水分解されることで薬効を失ったり、獲得したりするだけでなく、加水分解代謝物が毒性を発揮する原因物質となる場合もある。加水分解反応は薬物動態学および毒性学的に重要であるにも関わらず、その反応を担う酵素の研究はシトクロム P450 に比べ遅れをとっている。加水分解酵素の中でもカルボキシエステラーゼ(CES)が最もよく研究されているが、申請者はAADACがフェナセチン、リファンピシン、ケトコナゾールなど多くの医薬品を加水分解することを明らかにし、AADACを新規薬物加水分解酵素として位置づけた。今やAADACはCESと並び医薬品の加水分解を評価する際に考慮すべき酵素として広く認知されるようになった。申請者らの基質特異性解析により、AADACはアセトキシ基を有する化合物の“脱アセチル化反応”を触媒することが明らかになっている。

生体内には化合物のアセチル化反応を触媒するN-アセチル基転移酵素(NAT)が存在する。医薬品がNATによりアセチル化されると、薬理作用を失うものが多く、一方、焼け焦げなどの食品由来成分や環境物質のアセチル体は発癌につながる。また、セロトニンやコエンザイムAなどの内因性化合物はアセチル化されることにより機能が変化する。NATには遺伝子多型が存在し、医薬品による薬効や毒性の個人差をおおよそ予測することができるものの、それだけでは個人差を完全に説明できていない。ヒトAADACにも遺伝子全欠損を含む遺伝子多型が存在し、酵素活性に大きな個人差が認められる。興味深いことに、AADAC遺伝子を欠損しているヒトでは神経疾患であるトゥレット症候群の発症率が高いことが報告されており (*Biol Psychiatry* 79:383-391, 2016)、AADACが生理機能に重要な内因性化合物の代謝を担っている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

- (1) AADACが脱アセチル化反応を触媒することを考えると、NATの酵素活性に対して拮抗し、アセチル化体生成効率を減弱させることが考えられた。そこで、AADACがどのようなアセチル化合物の代謝反応を触媒し、薬効や毒性に対して影響を与えようかどうか明らかにすることを目的とした。
- (2) AADACは外来異物のみならず内因性化合物の代謝にも関与することが考えられる。実際、AADACは脂質代謝に影響することが示唆されている (*J Hepatol* 59:336-343, 2013; *Biochem Pharmacol* 155:233-241, 2018)。そこで、AADACはどのような内因性化合物の代謝反応を触媒し、生理学的機能に影響するか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) イソニアジド、ダブソン、プロカインアミド、ニトラゼパムおよびダントロレンなどのN-アセチル代謝物やGlu-P-1およびセロトニンなどのO-アセチル代謝物の脱アセチル触媒能をヒトAADAC発現系およびヒト肝臓ミクロソーム(HLM)を用いてHPLCやLC-MS/MSを用いて評価した。もし、触媒能が認められた場合は、ヒトS9画分を用いて、NATとAADACの酵素活性のバランスを評価し、AADACがどの程度NATによるアセチル化効率に影響し得るか解析した。AADACが脱アセチル化反応を好んで触媒することをさらに明らかにするために、アセトキシ基を構造内に有し、かつ生体内で脱アセチル化反応を受けることが報告されている医薬品の加水分解能を解析した。
- (2) AADACがどのような内因性化合物の代謝に関与しているか調べるため、申請者はまず脂質に注目した。ヒト肝癌由来細胞を用いてヒトAADACが脂質蓄積を軽減させる能力を有しているか調べた。さらに、脂質代謝に関与する遺伝子の多くはperoxisome proliferator activated receptor α (PPAR α)により発現制御を受けるため、ヒトAADACも同様にPPAR α による発現制御を受け、脂質蓄積にまで影響するか調べた。
さらに、申請者が作成したAadacノックアウト(KO)マウスを用いて血漿中および肝臓中の脂質パラメータを解析し、*in vivo*レベルにおいてもAadacは脂質レベルを制御し得るか解析した。

4. 研究成果

- (1) 生体内でNATによってアセチル化され生成し得る様々なアセチル化合物(アセトキシ基含有化合物を含む)の脱アセチル化酵素活性をAADAC発現系およびHLMを酵素源として用いて評価した。イソニアジドやプロカインアミドなどのNATの典型的基質のアセチル代謝物ではいずれの酵素源においても脱アセチル化酵素活性は認められなかった。一部のアセチル代謝物(N-アセチルダプロンやN-アセチルアミノニトラゼパム)においてのみ、AADAC発現系およびHLMにおいて脱アセチル化反応が認められた。その中の1つ、N-アセチルアミノニトラゼパムはニトラゼパムの還元代謝物であるアミノニトラゼパムがNATによりアセチル化される

ことで生成する。このアセチル化反応に対し AADAC が逆反応を触媒することで抑制的機能を示すかどうか調べるため、ヒト肝臓 S9 画分におけるアミノニトラゼパムアセチル化酵素活性を AADAC 阻害剤であるエピガロカテキンガラートおよび *bis*(4-nitrophenyl)phosphate の存在下で評価した。しかし、酵素活性に変動は認められなかったため、*in vitro* において NAT に対する AADAC の抑制的機能を明らかにすることはできなかった。

In vivo においても NAT に対し AADAC が抑制的機能を示さないか調べるため、野生型および *Aadac* ノックアウト (KO) マウスにニトラゼパム (300 mg/kg, *p.o.*) を処置し、経時的に血漿中のニトラゼパムと代謝物であるアミノニトラゼパムおよび *N*-アセチルアミノニトラゼパムの濃度を測定した。その結果、*N*-アセチルアミノニトラゼパムの血漿中濃度は *Aadac* KO マウスにおいて野生型の約 5 倍高値で認められ、代償的にアミノニトラゼパムの濃度は *Aadac* KO マウスで低下傾向を示した。*N*-アセチルアミノニトラゼパムは催奇形性との関連性が示唆されているため、*Aadac* は毒性抑制機能を示すことが考えられるが、今回の条件では催奇形性を示すとされる濃度 (*Toxicol Appl Pharmacol*, 121:233-238, 1993) にまで達しなかった。

AADAC のアセトキシ基含有化合物に対する基質選択性をさらに明らかにするため、てんかん治療薬エスリカルバゼピン酢酸エステルおよび去勢抵抗性前立腺癌治療薬アピラテロン酢酸エステルの加水分解酵素活性を調べた。いずれも脱アセチル化反応を受けることにより、薬理活性体へ変換されるプロドラッグである。エスリカルバゼピン酢酸エステルの加水分解酵素活性はヒト AADAC 発現系および AADAC が発現するヒト肝臓と小腸のミクロソームにて認められた。また、遺伝子多型により R248S および X400Q の変異が認められる場合、酵素活性が著しく減少することも見出した。アピラテロン酢酸エステルの加水分解酵素活性もヒト AADAC 発現系および AADAC が発現するヒト肝臓と小腸のミクロソームにて認められた。本来、小腸管腔にて膵臓から分泌されるリパーゼにて加水分解されたのち、アピラテロンとして体内へ吸収されると言われていたが、アピラテロン酢酸エステルをマウスに経口投与した際、野生型マウスよりも *Aadac* KO マウスにて低い血漿中アピラテロン濃度が検出されたため、小腸管腔のみならず体内臓器中においてもアピラテロン酢酸エステルは加水分解され、AADAC が薬効体生成量を制御することが示された。

以上のように、AADAC はアセトキシ基を有する化合物を選択的に加水分解することが示されたが、NAT によりアセチル化されて生成する代謝物に対しては加水分解反応能を示すものが限られることが明らかになった。アセトキシ基を有する化合物の中でも、AADAC の基質となるものの化学構造学的特徴を明らかにするには、さらなるアプローチが必要である。

- (2) マウス *Aadac* は脂質代謝に関連する遺伝子の発現制御を担う PPAR α により発現制御を受けることが知られている (*J Biol Chem*, 269:21650-21656, 1994)。そこで、ヒト AADAC も同様に PPAR α により発現制御を受けるか、内因的に AADAC を発現するヒト肝癌由来細胞 Huh-7 細胞を用いて調べた。PPAR α のリガンドであるフェノフィブリン酸および WY-14643 を処置すると AADAC の mRNA およびタンパク質発現量が上昇し、PPAR α の過剰発現およびノックダウンによりその上昇率はそれぞれ増加および減少した。さらにルシフェラーゼアッセイや ChIP アッセイにおいて、ヒト AADAC 遺伝子のの上流領域に PPAR α 応答配列が存在することも見出した。AADAC が PPAR α による発現制御を受けるということは、AADAC は脂質代謝に関係していることが考えられる。Huh-7 細胞に AADAC を過剰発現させ、オレイン酸とパルミチン酸の脂肪酸混合液を処置したところ、細胞内脂肪蓄積の抑制が認められた。反対に、AADAC をノックダウンすることにより、脂肪蓄積の増大が認められた。以上より、AADAC は脂質蓄積を抑制する機能があることを明らかにした。

In vivo においても AADAC は脂質量を制御し得るのか調べるため、野生型および *Aadac* KO マウスの肝臓中および血漿中脂質量を比較した。8 週齢のマウスにおいて、*Aadac* KO マウスで野生型マウスと比較し、肝臓および血漿中リン脂質量の低下傾向が認められた。17 週間高脂肪食を給餌した条件では、*Aadac* KO マウスで野生型マウスと比較し、肝臓中トリアシルグリセロール、総コレステロールおよびリン脂質量の上昇傾向が認められ、特にフリーコレステロール量の有意な上昇が認められた。逆に、血漿中トリアシルグリセロールとリン脂質量は減少傾向が認められ、特に総コレステロールおよびフリーコレステロール量の有意な減少が認められた。これらの脂質構造内にはエステル結合が存在するものの、アセトキシ基ではなく、オレイン酸やパルミチン酸がエステル結合したものであるため、AADAC が脂質分解に関与しているとは考えにくい。AADAC が肝臓から血漿中への脂質分泌を促進する機能を有することが考えられ、そのメカニズム解明が今後の課題である。

以上、本研究課題では、AADAC がアセトキシ基を有する化合物を加水分解し、NAT によりアセチル化された代謝物の一部を加水分解することにより、NAT 酵素活性に対して拮抗することが示された。また、AADAC は薬物代謝の他に脂質量を制御する機能を有していることも明らかにした。脂質制御メカニズムがまだ不明であるため、未知なる AADAC の機能を解明することが、トゥーレット症候群など、AADAC が関与すると考えられる他の疾病発症メカニズムの解明につながるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirosawa Keiya, Fukami Tatsuki, Tashiro Kiyomichi, Sakai Yoshiyuki, Kisui Fumiya, Nakano Masataka, Nakajima Miki	4. 巻 49
2. 論文標題 Role of Human Arylacetamide Deacetylase (AADAC) on Hydrolysis of Eslicarbazepine Acetate and Effects of AADAC Genetic Polymorphisms on Hydrolase Activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Disposition	6. 最初と最後の頁 322 ~ 329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/dmd.120.000295	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakai Yoshiyuki, Fukami Tatsuki, Nagaoka Mai, Hirosawa Keiya, Ichida Hiroyuki, Sato Rei, Suzuki Kohei, Nakano Masataka, Nakajima Miki	4. 巻 284
2. 論文標題 Arylacetamide deacetylase as a determinant of the hydrolysis and activation of abiraterone acetate in mice and humans	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 119896 ~ 119896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2021.119896	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Morikawa Tomomi, Fukami Tatsuki, Gotoh-Saito Saki, Nakano Masataka, Nakajima Miki	4. 巻 199
2. 論文標題 PPAR regulates the expression of human arylacetamide deacetylase involved in drug hydrolysis and lipid metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 115010 ~ 115010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bcp.2022.115010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukami Tatsuki, Yokoi Tsuyoshi, Nakajima Miki	4. 巻 62
2. 論文標題 Non-P450 Drug-Metabolizing Enzymes: Contribution to Drug Disposition, Toxicity, and Development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annual Review of Pharmacology and Toxicology	6. 最初と最後の頁 405 ~ 425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1146/annurev-pharmtox-052220-105907	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 廣澤啓也、深見達基、田代精亨、酒井慶之、亀水文弥、中野正隆、中島美紀
2. 発表標題 Role of human AADAC on hydrolysis of eslicarbazepine acetate and effects of AADAC genetic polymorphisms on hydrolase activity
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第35回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 酒井慶之、深見達基、長岡茉唯、廣澤啓也、市田裕之、佐藤怜、鈴木康平、中野正隆、中島美紀
2. 発表標題 アピラテロン酢酸エステル薬理活性体への代謝におけるアリルアセタミドデアセチラーゼの役割
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsuki Fukami
2. 発表標題 Toxicological relevance of non-P450 enzymes: hydrolases and aldehyde oxidase
3. 学会等名 12th International ISSX Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深見達基、中島美紀
2. 発表標題 薬物動態および毒性の理解促進のための薬物代謝酵素基礎的知見
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森川朋美、深見達基、中野正隆、中島美紀
2. 発表標題 薬物加水分解酵素AADACのPPAR α を介した転写制御および脂質代謝に対する役割
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第133回例会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関