

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790207

研究課題名（和文） 脳内薬物代謝酵素の領域特異的機能解明と脳内薬物相互作用の予測

研究課題名（英文） Determination of differential UGT expression in brain region and prediction of drug interaction via UGT

研究代表者

加藤 美紀（KATOHI MIKI）

名城大学・薬学部・准教授

研究者番号：70345594

研究成果の概要（和文）：ラット脳 UGT1A 分子種およびウンベリフェロングルクロン酸抱合活性およびアセトアミノフェングルクロン酸抱合活性は脳部位ごとに異なる発現量および活性値を示すことを明らかにした。またフェノバルビタール投与により、脳 UGT1A1、UGT1A6、UGT1A7 の mRNA 発現量は増加し、アセトアミノフェングルクロン酸抱合活性の上昇も認められた。

研究成果の概要（英文）： All UGT1A isoforms and UGT1A enzyme activities were detected in 9 regions of the rat brain. We showed that phenobarbital treatment induced UGT1A1, UGT1A6, and UGT1A7 mRNA expression and enzyme activities in some regions of the rat brain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：薬物動態学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：脳、グルクロン酸抱合、UGT1a、mRNA、誘導

1. 研究開始当初の背景

21 世紀は脳の世紀と呼ばれている。脳科学研究により、現代社会が抱える深刻な問題である高齢者の認知症やうつ病などの精神疾患や記憶障害、子供の学習・社会性・行動の障害が解明されることで、我が国の医療・福祉の向上に貢献できると考えられる。

薬物の薬効と副作用発現には薬物の体内動態が深く関与している。治療効果向上ならびに副作用の軽減を目指すためには、薬物動態を理解せねばならない。薬物動態に関与する因子として最も重要なものは薬物代謝酵素である。一般的に薬物代謝酵素は肝臓に高く発現しているため、肝臓における薬物代謝酵素ならびに薬物代謝酵素が介する薬物相互作用に関する研究は数多くなされている。しかし、脳内にも薬物代謝酵素の存在が示唆

されている。代表的なものとして、薬物代謝反応の中心を担うチトクロム P450 2D6 や UGT が挙げられる。特に、UGT はセロトニンや甲状腺ホルモンなどの内因性基質だけでなく、抗うつ薬、抗てんかん薬や麻薬性鎮痛薬など、脳内で薬理作用を発現する必要がある薬物を代謝する。

ヒトの脳を用いて実験することは倫理的にも極めて困難であるため、動物実験を代替法とすることが現状では最も妥当であると考えられる。ラットは従来、脳科学研究に頻用されてきた動物である。人間の脳はラットに比して圧倒的に大脳が大きい、小脳や脳幹は類似しており、神経伝達の基本回路や基本的反応も同じと言われている。従って、脳内動態の解明には第一にラットにおける脳内動態を明らかにし、それを基にヒトへの予

想を模索することが最善であると考えられる。

2. 研究の目的

これまでの実験脳科学における研究の蓄積により、高次機能を司る脳領域の作動原理と領域特異性についての解明が進みつつあるが、脳内における UGT の発現や薬物代謝能の領域特異性についてはほとんど明らかになっていない。そこで申請者は、脳機能障害疾患に対する創薬ならびに薬物療法の適正化のためにも、脳内における UGT の領域特異的な機能解明が必須であり急務であると考えた。脳科学的手法を薬物動態分野に応用することで、薬物動態学的視点から脳機能を解明することを試みた。特に、1. 脳 UGT 分子種発現の領域特異性解明と 2. 脳内での UGT を介する薬物相互作用の可能性に関して明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

アセトアミノフェン、エチレンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸 (EDTA)、クロロホルム、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris)、ピロカルボン酸ジエチル (DEPC) 処理水、2-プロパノール、はナカライテスク (Kyoto, Japan) より購入した。TRIzol 試薬は Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) より購入した。ReverTra Ace qPCR RT Kit は TOYOBO (Osaka, Japan) より購入した。RQ1 RNase-Free DNase は Promega (Madison, WI, USA) より購入した。プライマーの合成は Greiner bio-one (Tokyo, Japan) に委託した。SYBR Premix Ex Taq[®] (Takara Ex Taq HS, dNTP mixture, MgCl₂) は Takara Bio (Shiga, Japan) より購入した。アセトニトリル、4-アミジノフェニルメタンスルホニルフルオリド (APMSF)、メタノール、MgCl₂ は和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した。アセトアミノフェン β-D-グルクロニド ナトリウム塩、アラメチシン、UDPGA、グリセロール、ウンベリフェロン (7-ヒドロキシマリリン)、ウンベリフェロン β-D-グルクロニドナトリウム塩は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。試料および器具は適宜オートクレーブ処理 (121°C、40 分) した。

(2) 臓器摘出

8 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットの脳を常法に従い、小脳、前頭皮質、頭頂皮質、梨状皮質、海馬、延髄、嗅球、線条体、視床に 9 分割した。なお、フェノバルビタールによる UGT の誘導に関する検討においては、8 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットにフェノバルビタール 80 mg/kg/day を 7 日間連続腹腔内投与後、脳を常法に従い 9 分割した。

(3) total RNA の抽出

TRIzol 試薬のプロトコールに従い、total RNA を抽出した。なお、各臓器から抽出した total RNA はラット 5 匹のプールとした。

(4) デオキシリボヌクレアーゼ処理

RQ1 RNase-Free DNase を用いてプロトコールに従い、(3) で得られた total RNA から genome DNA を除去した。

(5) 逆転写反応

ReverTra Ace qPCR RT Kit を用いてプロトコールに従い、total RNA から complementary DNA を合成した。

(6) リアルタイム PCR

(5) で得られた cDNA 溶液と UGT1A サブファミリーの各分子種に特異的なプライマー、SYBR Premix Ex Taq[®] を用いて、リアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR の反応条件は以下の通りである。

Stage 1 : 95°C、10 sec

Stage 2 : 95°C、5 sec (Stage 2
60°C、30 sec repeat 40 cycles)

なお、ハウスキーピング遺伝子として β-actin を用いて補正した。

(7) 脳ミクロソームの調製

ミクロソームは常法に従い調製した。各部位から調製したミクロソームは 10 匹のプールとした。

(8) グルクロン酸抱合活性

分析カラムは Inertsil ODS-3 2.1×150 mm (GL Sciences, Tokyo, Japan) を用いた。

8-1. ウンベリフェロングルクロン酸抱合活性測定

最終濃度が Tris-HCl 50 mM、MgCl₂ 5 mM、アラメチシン 25 μg/mL、ウンベリフェロン 1 mM、ミクロソームタンパク質 0.5 mg/mL となるように超純水を加えて全量 180 μL とした。37°C で 2 分間プレインキュベーションを行った後、UDPGA (最終濃度 3 mM) を 20 μL 添加することで反応を開始した。37°C で 60 分間インキュベーションした後、3 分間煮沸することで反応を終結させた。4°C、15,000 g で 10 分間遠心分離し、得られた上清 10 μL を LC-MS/MS で測定した。

8-2. アセトアミノフェングルクロン酸抱合活性測定

最終濃度が Tris-HCl 50 mM、MgCl₂ 5 mM、アラメチシン 25 μg/mL、アセトアミノフェン 1 mM、ミクロソームタンパク質 0.5 mg/mL となるように超純水を加えて全量 180 μL とした。37°C で 2 分間プレインキュベーションを行

った後、UDPGA（最終濃度 3 mM）を 20 μ L 添加することで反応を開始した。37°C で 60 分間インキュベートした後、3 分間煮沸することで反応を終結させた。4°C、15,000 g で 10 分間遠心分離し、得られた上清 10 μ L を LC-MS/MS で測定した。

(9) 統計学的処理

有意差検定には Student's-*t* 検定を用いた。なお、 $p < 0.05$ の時、有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 脳内 UGT1A mRNA の発現

同一分子種について部位間での mRNA 発現量を比較したところ、高い発現量が認められたのは、UGT1A1 では小脳および嗅球、UGT1A2 では嗅球、UGT1A3 では頭頂皮質、梨状皮質、延髄、嗅球および線条体、UGT1A5 では小脳、UGT1A6 では小脳および延髄、UGT1A7 では頭頂皮質および嗅球であった。しかし UGT1A8 の発現量はいずれの部位においてもほぼ同等であった。紙面の関係上、UGT1A6 のみ結果を示した (Fig. 1)。同一部位について各分子種の発現量を比較したところ海馬では UGT1A1 の発現が最も高く、前頭皮質、頭頂皮質、梨状皮質では UGT1A3、小脳、延髄では UGT1A6 の mRNA が高い発現を示した。

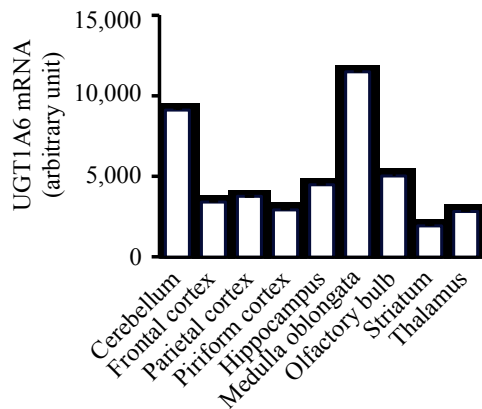


Fig. 1. UGT1A6 mRNA expression in rat brain.

(2) 脳内グルクロン酸抱合活性

ラット脳各部位のミクロソームを用いて、ウンベリフェロングルクロン酸抱合活性 (Fig. 2) とアセトアミノフェングルクロン酸抱合活性を測定したところ、全ての部位でグルクロン酸抱合活性が認められた。また、グルクロン酸抱合活性は部位ごとに異なることを明らかにした。

ウンベリフェロンは UGT1A サブファミリーの代表的な基質であるが、複数の分子種を介して抱合されることが知られている。ヒトにおいてウンベリフェロンは UGT1A1、UGT1A3、UGT1A6、UGT1A7、UGT1A8、

UGT1A9、UGT1A10 を介して抱合される。また、アセトアミノフェンはラットにおいて、UGT1A6 と UGT1A7 で主に抱合される。各 UGT1A 分子種の機能を明らかにするためには、分子種特異的な基質を用いて検討を行う必要があるが、現在のところ、特異的な基質が存在しない。従って、複数の分子種で触媒される反応を指標として用いたが、いずれの基質においても、脳内において抱合されることを明らかにした。

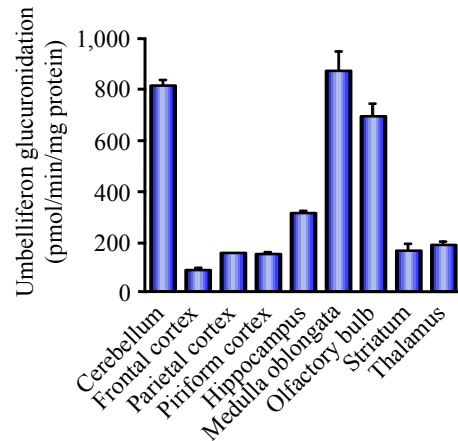


Fig. 2. Umbelliferone glucuronidation in rat brain.

以上 (1) と (2) より、ラット脳内に UGT1A 分子種が発現し、酵素活性を有しているが、発現している分子種と発現量、さらにその抱合活性は脳の部位によって異なることが明らかとなった。従って、脳内に移行した薬物はその部位に発現している UGT により代謝される可能性が示された。

(3) フェノバルビタール投与によるラット脳内 UGT1A1、UGT1A6 および UGT1A7 mRNA 発現量の変動

フェノバルビタール投与群の UGT1A1 mRNA 発現量は、コントロール群と比較して線条体で 4.0 倍に有意に上昇した。また、UGT1A6 では頭頂皮質、梨状皮質、海馬、延髄、嗅球、線条体、視床で 1.2~3.0 倍に有意に上昇した。さらに、UGT1A7 は梨状皮質、海馬、延髄、嗅球、線条体、視床で 1.2~2.6 倍に有意に上昇した。紙面の関係上、UGT1A6 のみ結果を示した (Fig. 3)。

ラット UGT1A1 はヒト UGT1A1 の相同遺伝子であり、内因性物質であるビリルビンの代謝や β -エストロジオールの抱合反応に関わっている。ヒト UGT1A1 の上流には phenobarbital response enhancer module と呼ばれる応答配列の領域が存在し、constitutive androstane receptor (CAR) の結合領域を含んでいる。また、ラット UGT1A1 の上流にも CAR の応答配列領域が存在することが知ら

れている。そのため、ラット UGT1A1 およびヒト UGT1A1 は CAR を介した機序で転写活性化を生じ、誘導されると考えられる。

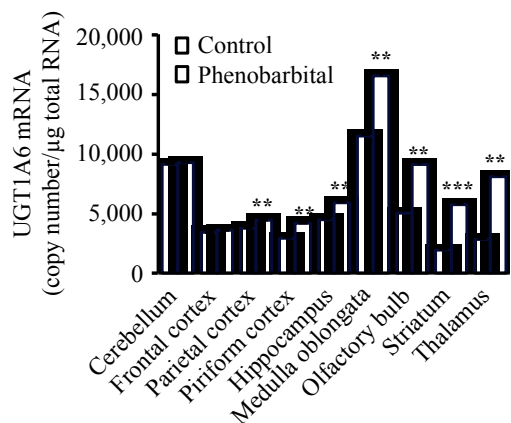


Fig. 3. Changes in UGT1A6 by the treatment with phenobarbital in rat brain.

フェノバルビタールは主に CAR を活性化することにより、多くの薬物代謝酵素を誘導する。本研究の結果から、脳においても UGT1A1 の誘導が認められ、これには CAR を介した機序が関与するものと考えられる。一方、ラット UGT1A6 はヒト UGT1A6 の相同遺伝子であり、内因性物質であるセロトニンのグルクロン酸抱合反応に関与する。また、ラット UGT1A7 はヒト UGT1A7 の相同遺伝子であると考えられており、肝外臓器における発現が高く、内因性物質であるチロキシンを含む多くの物質を抱合することが報告されている。本フェノバルビタール投与により、小脳および前頭皮質を除くすべての部位で、UGT1A6 mRNA の発現は有意に増加した。UGT1A7 についても、小脳、前頭皮質および頭頂皮質を除いた部位において mRNA の発現は有意に増加した。UGT1A6 および UGT1A7 の上流に CAR の結合領域が存在するとの報告はなされていないため、フェノバルビタール投与による UGT1A6 および UGT1A7 mRNA 発現量の誘導メカニズムについては更なる検討が必要である

(4) フェノバルビタール投与によるラット脳内アセトアミノフェングルクロン酸抱合活性の変動

コントロール群およびフェノバルビタール投与群ともにすべての部位でアセトアミノフェングルクロン酸抱合活性が認められた (Fig. 4)。また、フェノバルビタール投与により、小脳、海馬、延髄、視床で 1.2~1.8 倍に有意に上昇した。一方、嗅球では 0.6 倍と有意な減少が認められた。

以上、(3) と (4) より、フェノバルビタールの服用により、肝と同様に脳内においても UGT1A 分子種の誘導が生じ、脳内グルクロン酸抱合活性が変動してすることを明

らかにした。脳部位により誘導率の違いが生じる要因として、薬物代謝酵素の発現を調節する核内転写因子の発現量の差異やフェノバルビタールの脳内移行性の差異が考えられる。薬物の脳内移行の部位差については、dodeca-2E,4E,8E,10E/Z-tetraenoic acid isobutylamide を 2.5 mg/kg 経口投与したラットにおいて、海馬、大脳皮質、線条体、小脳における脳内濃度推移が部位ごとに異なることが報告されている。従って、フェノバルビタールも同様に脳各部位での濃度が異なる可能性があり、UGT1A 分子種の誘導に差異が生じたのかもしれない。フェノバルビタール脳移行性に関しては、更なる検討が必要である。

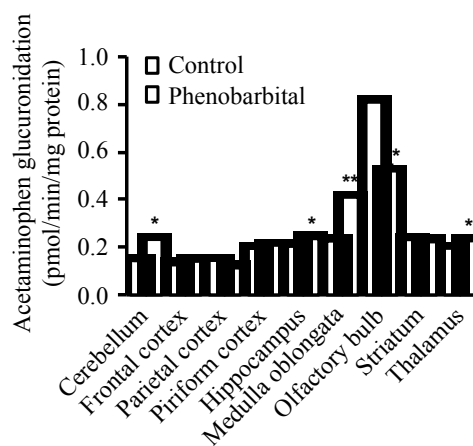


Fig. 4. Changes in acetaminophen glucuronidation by the treatment with phenobarbital in rat brain.

本研究結果は、脳内においてグルクロン酸抱合反応が進行し、それは脳部位により異なること、また、併用薬により脳内グルクロン酸抱合反応が誘導されるため、UGT を介した薬物相互作用が惹起される可能性を示した。UGT を介した脳内薬物代謝反応に関する基礎的情報を提供できたと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

(1) 榊原有季子、加藤美紀、近藤裕也、灘井雅行：フェノバルビタールによる脳内解毒酵素の発現変動 -UDP-グルクロン酸転移酵素の変動-。フォーラム 2012：衛生薬学・環境トキシコロジー (名古屋) 平成 24 年 10 月 26 日

(2) Yukiko Sakakibara, Miki Katoh, Yuya Kondo and Masayuki Nadai: Effects of Phenobarbital Treatment on UDP-glucuronosyltransferase 1A Subfamily in Rat Brain. 19th Microsomes and Drug

Oxidations (MDO) and 12th European International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX) meeting (Noordwijk aan Zee, Netherlands) 平成 24 年 6 月 18 日

(3) 榊原有季子、加藤美紀、近藤裕也、灘井雅行：フェノバルビタールのよるラット脳内 UDP-グルクロン酸転移酵素 1a サブファミリーの誘導に関する研究. 日本薬学会第 132 年会（札幌）平成 24 年 3 月 30 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 美紀 (KATOHI MIKI)
名城大学・薬学部・准教授
研究者番号：70345594

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：