

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 5 月 20 日現在

機関番号：35413

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成 23 年 ～平成 24 年

課題番号：23790212

研究課題名（和文） 小児の発育に伴う薬物代謝酵素の活性変動と薬理効果を考慮した
最適な医薬品投与設計研究課題名（英文） Dose adjustment based on the developmental changes of drug metabolic enzyme
activity and their pharmacological activity.

研究代表者 田山 剛崇 (TAYAMA YOSHITAKA)

広島国際大学・薬学部・講師

研究者番号：80389121

研究成果の概要（和文）：

モリブデン(Mo)含有酵素である aldehyde oxidase (AO)および xanthine oxidase (XO)は、発育に伴って、その活性・タンパク発現量が変動した。さらに、AO および XO 活性と Mo cofactor Synthesis (MOCS) protein 発現量の間には良好な相関が認められた。

Allopurinol は AO、XO によって代謝されることが報告されている。従って、発育に伴う AO と XO 活性変動が allopurinol 代謝に及ぼす影響を検討した。併せて、allopurinol の薬理作用である XO 阻害効果の変動についても検討した。XO 阻害効果は、ratio of xanthine (RX 値): xanthine/(xanthine+hypoxanthine)にて評価した。Allopurinol 酸化代謝活性は、3 週齢: 1.69 nM/60 min/mg protein, 6 週齢: 8.93 nM/60 min/mg protein であった。また、発育に伴い、XO 活性の低下が認められた(RX 値 3 週齢:0.76, 6 週齢:0.56)。これらの結果は、代謝物である oxypurinol 増加に起因するものである。次に、febuxostat (XO 特異的阻害剤)、raloxifene (AO 特異的阻害剤)を用いて、allopurinol 酸化活性における AO 寄与度(% of control)を検討した。3 週齢における AO 寄与度は 18.0%、6 週齢は 80.7%であった。Allopurinol 代謝における AO の寄与度は、発育に伴い、大きく異なることが示された(3 週齢:18.0%,6 週齢:80.7%)。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we observed the developmental changes of aldehyde oxidase (AO) and xanthine oxidase (XO) in postnatal rat liver. The expression of AO was closely correlated with the oxidase activity. As for XO, there was good relation to the expression of XO, as like AO. It is said that AO and XO contain molybdenum (Mo) in their active center, and then Mo cofactor effect on the activity. We evaluated the developmental changes of Mo cofactor Synthesis (MOCS) protein. There is the developmental change on MOCS protein, and we observed the good relation to AO and XO activity. Thus, the AO and XO activity are regulated by both the expression of the enzyme and MOCS protein.

Allopurinol is metabolized to oxypurinol, a potent XO inhibitor, by AO and XO. We examined the change of allopurinol metabolism and their efficacy by the developmental changes. Allopurinol efficacy is evaluated as the XO inhibition. The level of XO activity was predicted from the ratio of xanthine and hypoxanthine in the cytosols, calculated according to the following equation: Ratio of xanthine formation (RX) = [(xanthine/ (xanthine + hypoxanthine))]

Three weeks aged rats have lower allopurinol oxidase activity than 6 weeks aged rats (3 weeks: 1.69 nmol /60 min/mg protein, 6 weeks: 8.93 nmol /60 min/mg protein). The level of RX, the index of XO activity, in 3 weeks rats was higher than that in 6 weeks rats (3 weeks: 0.76, 6 weeks: 0.56). The allopurinol efficacy, XO inhibition, was increased with age. We evaluated the contribution of allopurinol metabolism by AO and XO. AO metabolite 18.0% of allopurinol in 3 weeks aged rats. On the other hand, AO metabolite 80.7% in 6 weeks aged rats. It was observed that the contribution by AO on allopurinol metabolism changes with age.

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：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：小児、新生児、薬物代謝、医薬品適正使用

1. 研究開始当初の背景

小児に使用される医薬品の多くは、その用法・用量が未承認である。現在、小児の薬物治療領域において、使用経験の少ない医薬品の投与量は Young 式や Augsberger 式等を用いることにより、決定される場合が多く、薬物代謝酵素の活性変動と投与されている用量との関係は、十分に検討がなされていない。また、代謝酵素が異なる医薬品に、これらの式をすべて適応させることは極めて困難であり、小児の成長に伴う代謝酵素活性の変動を十分に反映できない。従って、小児に汎用されている医薬品の投与量に関し、早急な検討が必要である。

2. 研究の目的

- ①ラット出生日齢に伴うモリブデン(Mo)含有酵素(xanthine oxidase(XO)および aldehyde oxidase (AO))の活性とそのタンパク発現量の変動を検討した。
- ②発育に伴う Mo 含有代謝酵素の活性変動モデルを作成するため、Mo 含有酵素の活性変動因子であるタンパク構造変化および Mo cofactor の生合成に関する Gephyrin (GEPH) や Mo Cofactor Synthesis (MOCS) protein の発現量変化を検討した。
- ③小児薬物領域において、抗腫瘍剤投与による高尿酸血症治療に汎用されている allopurinol を用いて、その酸化代謝に及ぼす発育の影響を検討した。

3. 研究の方法

①生後 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 週齢の jcl:Wister ラットおよび Crlj:SD ラットラットを屠殺後、肝を摘出し、cytosol 画文を作成した。その後、cytosol 中の XO 活性および AO 活性を測定した。なお、XO 活性は XO 特異的基質である 1-methyl xanthine から 1-methyl uric acid への酸化活性より求めた。AO 活性は、AO 特異的基質である N1- methyl nicotinamide (NMN)から N1-methyl-2-pyridone-5-carboxamideN1-methyl-4-pyridone-3-carboxamide への酸化代謝活性(2009-2010 年度 課題番号 21790170 にて実施済)、phenanthridine から phenanthridone への酸化代謝活性より求めた。

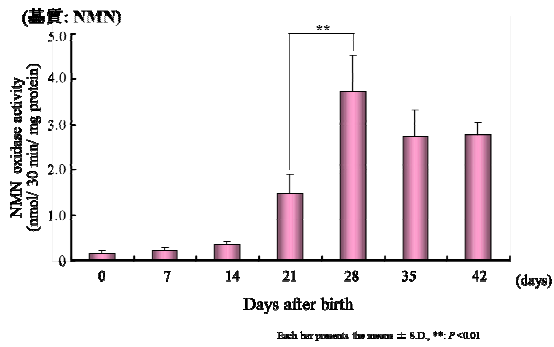
②AO, XO, GEPH, MOCS のタンパク変動は、SDS-PAGE 電気泳動後、Western blotting により、検討を行った。

③Jcl:Wister ラット(3, 6週齢)より肝 cytosol 画分を作成した。Allopurinol 酸化代謝活性は oxypurinol 産生量より評価した。

また、薬理学的効果の指標である XO 阻害効果は cytosol 中の内在性 hypoxanthine および xanthine 濃度比を用いて検討した。

4. 研究成果

①生後直後から 3 週齢まで、XO および AO 活性は認められなかった。4 週齢にて、両酵素とも急激に活性上昇が認められ、成獣と同様の活性を示した。タンパク発現量に関しても、3 週齢より急激な発現量の増加が確認された。(Fig. 1, 2, 3)



2009-2010 年度 課題番号 21790170 科研費報告書より引用

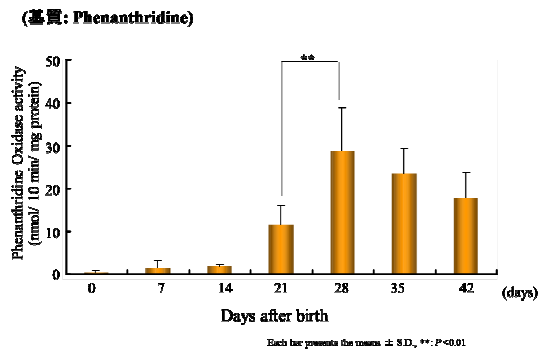


Fig. 1 発育に伴う AO 活性変動

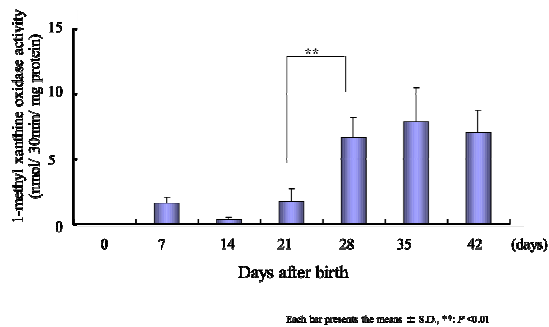


Fig. 2 発育に伴う XO 活性変動

②生後 0 週齢より GEPH タンパクの発現を認め、発育に伴い、その発現量が増加した。(Fig. 3) 同様に、MOCS においても生後 0 週齢よりタンパク発現を認め、発育に伴い発現量が増大した。さらに、AO および XO 活性の間に良好な相関が認められた。AO および XO 活性は、そのタンパク発現量に加え、MOCS や GEPH などの Mo Cofactor 生成系によっても制御されている可能性が示唆された。(Fig. 4, 5)

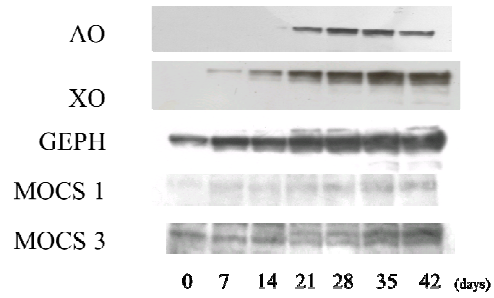


Fig. 3 発育に伴う Mo 含有酵素および Mo cofactor 関連タンパクの発現変動

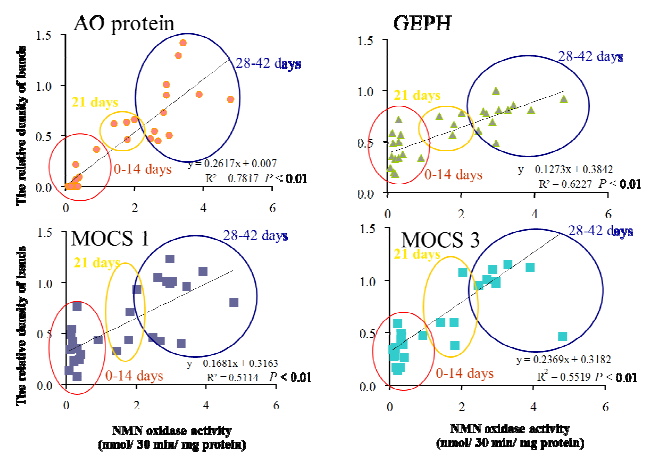


Fig. 4 AO タンパク発現量とおよび Mo cofactor 関連タンパク発現量の相関

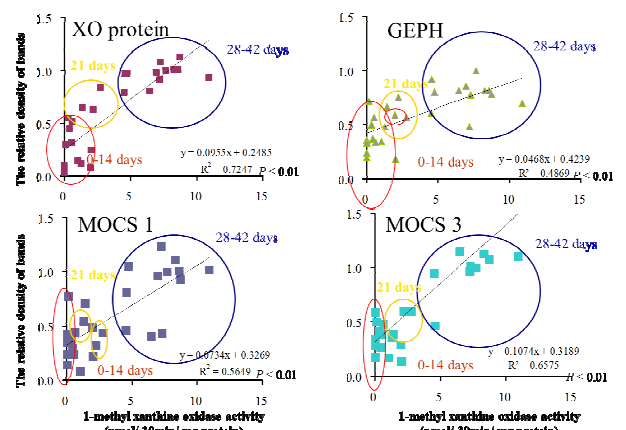


Fig. 5 XO タンパク発現量とおよび Mo cofactor 関連タンパク発現量の相関

③3週齢ラットのAO活性は成獣の47.8%、XO活性は23.5%であった。(data not shown)

成獣に対する3週齢ラットのallopurinol (62.5 μM) 酸化代謝活性は、およそ19.0% (3週齢: 1.69 nM/60 min/mg protein, 6週齢: 8.93 nM/60 min/mg protein)であった。(Fig. 6) その際、薬理効果の指標であるratio of xanthine (RX 値): xanthine/(xanthine + hypoxanthine)は、3週齢において0.76、6週齢は0.56であった。代謝物であるoxypurinol増加に伴い、XO活性の低下が認められた。次に、XO特異的阻害剤であるfebuxostat、AO特異的阻害剤であるraloxifeneを用いて、allopurinol酸化活性(% of control)におけるAO寄与度を検討した。3週齢におけるAO寄与度は18.0%、6週齢は80.7%であった(Fig. 7)。Allopurinol代謝におけるAOの寄与度は、発育に伴い、大きく異なることが示された。一方、RX値は3、6週齢ともにAO活性阻害時と非阻害時との間に差は認められなかった。この要因として、検討を行ったoxypurinol産生はそのXOに対するKi(50 nM)よりも高値であったためと考えられる。今後、臨床濃度での検討が必要と考える。

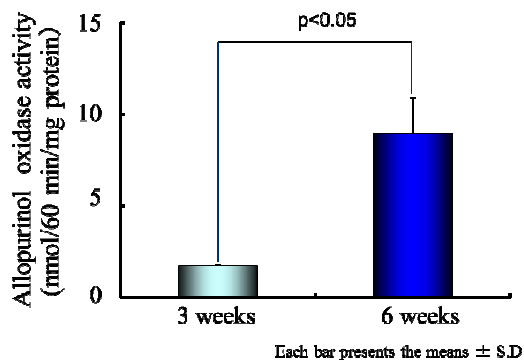


Fig. 6 Allopurinol (62.5 μM) 酸化代謝における週齢の影響

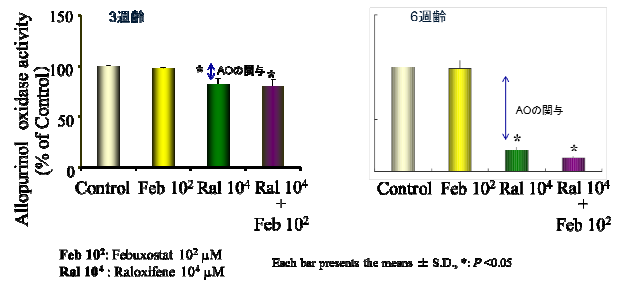


Fig. 7 Allopurinol (62.5 μM) 酸化代謝におけるAOの寄与

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Tayama Y, Sugihara K, Sanoh S, Miyake K, Kitamura S, Ohta S.

Developmental changes of aldehyde oxidase activity and protein expression in human liver cytosol.

Drug Metab. Pharmacokinet. **27**, 543-7. (2012).

査読有

〔学会発表〕(計2件)

田山 剛崇, 杉原 数美, 三宅 勝志, 北村 繁幸, 太田 茂

Allopurinol代謝におけるxanthine oxidaseおよびaldehyde oxidaseの関与

日本薬学会 第133年会

2013年3月・横浜

田山 剛崇, 杉原 数美, 三宅 勝志, 北村 繁幸, 太田 茂

ラット発育における肝 Gephyrin および Mo Cofactor Synthesis タンパク質の発現変動

日本薬学会 第132年会

2012年3月・札幌

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者 広島国際大学・薬学部・講師
田山 剛崇 (TAYAMA YOSHITAKA)
研究者番号: 80389121