

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790139

研究課題名(和文) 生細胞内におけるUGT分子種の発現量比変動時の抱合活性および基質特異性変動の評価

研究課題名(英文) Evaluation of variation of glucuronidation activity and substrate specificity caused by difference in the proportion of expression level of UGT isozymes in living cells

研究代表者

武隈 洋 (TAKEKUMA, Yoh)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00396293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、薬物代謝酵素であるUGTのin vitro活性評価時みられるin vivo活性との乖離の要因を明らかにするため、生細胞(in vivoに近いモデル)内のUGT活性を評価する系として、LLC-PK1細胞を利用し、基質を氷上で2時間インキュベートした後、37℃に戻し、細胞外へ排出された代謝物を定量することで代謝活性を測定可能な系を構築した。

更に、HeLa細胞にUGT1A9を導入した安定細胞を作成し、この細胞に一過性にUGT2B4を導入・発現させたところ、UGT2B4導入時にUGT1A9活性が低下し、UGT-UGT蛋白質間相互作用の影響が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the factor of gap between UGT activity evaluated by in vitro and in vivo assay. Then we have developed an assay method to determine UGT activity in living cells (as near in vivo model). The method is as follows: LLC-PK1 cells were incubated with substrate for 2 hours on ice. After incubating, the cells were incubated on water bath at 37 degree Celsius for enzymes and transporters working. And then metabolites were extracellularly excreted and quantified. Furthermore, we established stable HeLa cell line expressing UGT1A9 and introduced UGT2B4 into it. UGT1A9 activity of HeLa cells expressing UGT2B4 reduced. This result indicated the protein-protein interaction between the UGTs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：UGT 生細胞

1. 研究開始当初の背景

グルクロン酸転移酵素(以下 UGT)は、多くの内因性・外因性物質を基質とし、グルクロン酸を付加することにより基質の水溶性を高め、尿中や胆汁中への移行を容易にする役割を担う。薬物代謝に関与する UGT は、UGT1A と UGT2B サブファミリーが存在し、小胞体膜内側に局在する。一般に小胞体に存在する薬物代謝酵素では、ミクロソーム画分が酵素源として用いられ、基質特異性や速度論的解析などの研究が行われている。しかしながら、研究が先行して行われてきたチトクローム P450(以下 CYP)では、この *in vitro* の結果から *in vivo* の活性が比較的良好に予測可能であるが、UGT では必ずしも *in vivo* に外挿できないことが指摘されている。その理由として、CYP と異なり、反応系中に界面活性剤(アラメチシン)を添加して小胞体膜に穴を開け、基質との反応性を上げないと代謝活性を測定しにくいこと、UGT がホモオリゴマーやヘテロオリゴマーを形成し、それによってモノマーとは活性が異なること、CYP とのタンパク質間相互作用により活性変動が認められること、短鎖脂肪酸による反応阻害作用、さらにグルクロン酸抱合体の UGT 阻害作用などが報告されている。

一方、培養細胞を用いた検討では、ヒト肝由来の細胞株でも UGT 発現量が非常に小さい株が多く、また *in vivo* との発現プロファイルが異なっているなど、評価が難しいのが現状である。そこで、外来遺伝子を導入して研究されてきたが、一分子種の単独発現によるミクロソーム系やセルライセート系での評価が多く、タンパク質間相互作用を評価するために複数の分子種を量的に変動させた生細胞内での代謝に焦点を当てた研究は少ない。

2. 研究の目的

薬物代謝酵素の中で、主要な役割を担う第相酵素であるグルクロン酸転移酵素(以下 UGT)は、代謝酵素活性の評価に汎用されるミクロソーム系では *in vivo* 活性の予測が難しいことが指摘されている。その要因として、反応系中に界面活性剤を添加しないと活性が得られにくいこと、UGT-UGT や UGT-CYP 間相互作用により活性が変動することなどが報告されている。そこで本研究では、以下の2点を目的とする。

(1) 生細胞内での UGT 代謝活性を簡便に評価できる系を確立する。

(2) 培養細胞系を用いて、UGT 分子種を複数かつ発現量比を種々制御した際の活性変動を評価し、*in vivo* (個体)への外挿が可能な評価系への一助とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト UGT2B7 安定発現 LLC-PK1 細胞及び

ヒト UGT1A9 安定発現 HeLa 細胞の作成

UGT2B7 及び 2B4 の CDS 領域をそれぞれ pMAM2-BSD にサブクローニングし、作成したコンストラクトを Lipofection 法により UGT2B7 を LLC-PK1 細胞へ、UGT2B4 を HeLa 細胞へトランスフェクトした。Blasticidin S によりセレクションし、ヒト UGT2B7 安定発現 LLC-PK1 細胞及びヒト UGT1A9 安定発現 HeLa 細胞を作成した。

(2) 生細胞内での UGT 代謝活性測定

LLC-PK1 細胞をコラーゲンコート処理した 6 穴プレートに 9.6×10^5 cells/mL で 1 well に 2 mL ずつ播種し、24 時間培養した。氷上で細胞を 10 分間プレインキュベートした後、メディウムを除去し、基質として 7-ヒドロキシマリリン(以下 7-HC) 1 mM となるように調製した氷冷メディウムを 2 mL 加えて氷上で 2 時間インキュベートした。メディウム吸引後、37 に加温したメディウム 2 mL を加えて 37 に温めた水浴上で 5 分、10 分、15 分、25 分間インキュベートした。時間経過後、細胞外液中と細胞内の 7-HC およびその代謝物である 7-ヒドロキシマリリングルクロナイド(7-HCG)を定量した。

(3) LLC-PK1 細胞の単位蛋白質当たりの細胞容積の算出

LLC-PK1 細胞に非代謝性基質である 3-O-methyl glucose (300 μ M, 14 C/ μ L [3 H]-3-O-methyl glucose)を用いて取り込み実験を行なった。この際、 Na^+ イオン依存性の濃縮性グルコーストランスポーターおよび競合する基質の影響を排除するために、基質を溶解する緩衝液には NaCl 及びグルコース不含有のものを用い、促進拡散による輸送系のみが働く条件下で実験した。取り込みが平衡に達した時点の取り込み量及び細胞外液の濃度を測定した。また細胞中の蛋白質量を BSA を標準蛋白質として Lowry 法により測定した。細胞内外の濃度は同一であることから、これらの測定値から蛋白質量当たりの細胞内容積を算出した。

(4) 細胞破砕液による UGT 代謝活性の測定

プレートに培養した細胞を緩衝液で洗浄後スクレーパーを用いて回収し、超音波ホモジナイザーにより破砕することで細胞破砕液を調製した。この破砕液を酵素源として、終濃度 10 mM MgCl_2 、50 mM Tris-HCl 20 μ L、12.5 μ g/mL Alamethicin、1 mM UDP-glucuronic acid (pH 7.4) の反応液を調製して基質を添加し、37 で反応させた。基質には 7-HC 及びミコフェノール酸(以下 MPA)を用いた。一定時間後、氷冷したアセトニトリルを添加し激しく攪拌して反応を止め、遠心後上清を定量に供した。

(5) Proteo Tuner Shield system® (Clontech) による UGT2B4 共発現量の制御

pPTUNER ベクターにヒト UGT2B4 の CDS 領域をサブクローニングし、作成したコンストラクトを Lipofection 法により UGT 活性を有する MCF-7 及び(1)で作成した UGT1A9 安定発現 HeLa 細胞に一過性導入した。Shield 分子の存在下あるいは非存在下で 24 時間培養後細胞を回収し、ミクロソームを調製した。(cDNA を導入した細胞は、培地に添加する Shield 分子の添加量に依存してその発現量を制御できる。)

(6) 薬物の定量

7-HC 及び 7-HCG の定量は、蛍光検出器 (励起波長 316 nm, 蛍光波長 382 nm) を備えた UPLC を用いて行った。また、MPAG の定量は、UV 検出器 (256 nm) を備えた HPLC を用いて行った。 $[^3\text{H}]$ -3-O-methyl glucose の定量は、液体シンチレーション法により行った。

4. 研究成果

(1) 生細胞を用いた代謝活性の測定

まず UGT 活性評価のためのモデル薬物の一つとして、生細胞内でチトクローム P450 での代謝を受けないため、生細胞内での UGT 活性のみを評価しやすく、また多くの UGT 分子種の基質となる 7-HC を選択肢し、その定量法を確立した。

生細胞内の UGT 活性を評価する系として、ブタ腎臓細胞由来 LLC-PK1 細胞にヒト UGT2B7 遺伝子を導入して安定発現細胞を作製したが、UGT 活性が Mock の 2 倍程度にしか上昇しなかったため、LLC-PK1 細胞そのものを評価系に用いた。種々条件を検討し、生細胞の UGT 代謝活性を評価するために、以下の条件で安定して測定可能であることが明らかとなった。7-HC をメディアムに添加する際、氷上でインキュベートすることで、細胞内の代謝および排出系が働かない状態で細胞内の基質濃度を上げ、その後 37 °C で代謝、排出系を機能させた。氷上でのインキュベート時間は種々検討した結果、4 時間以上では細胞に障害が生じてくるため、平衡には達していなかったが 2 時間に設定した。1 mM の 7-HC をメディアム中に添加し、氷上で 2 時間インキュベートしたとき、細胞内の 7-HC 濃度は、約 300 μM であった。なお濃度算出には、予め測定しておいた細胞内容積 (8.8 $\mu\text{L}/\text{mg protein}$) を用いた。

細胞内の代謝物 (7-HCG) の蓄積はほとんどなく (図 1)、細胞外の 7-HCG を定量することで、生細胞の UGT 活性を評価できることが明らかとなった (図 2)。初期の細胞内 7-HC 存在量と細胞内容積から細胞内の初期濃度を算出し、代謝クリアランスを算出することで細胞破砕液代謝系との比較を可能とした。また、この生細胞系で 7-HCG の排出を抑えることにより、7-HCG を細胞内に蓄積させることで、抱合体による UGT 代謝阻害が起こるかを検証するために、阻害剤のスクリーニングをした。すなわち、グルクロン酸抱合体を排

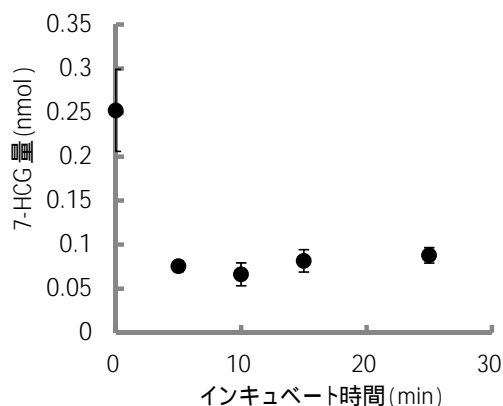


図1 LLC-PK1細胞に7-HC(1 mM)を氷上で2時間インキュベート後、37 °Cで代謝させたときの細胞内7-HCG量の時間推移 (n=3, 平均値 \pm SD)

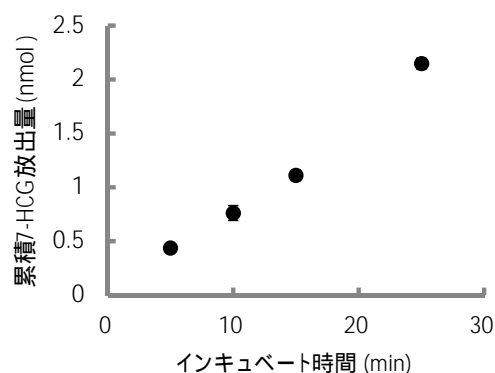


図2 LLC-PK1細胞に7-HC(1 mM)を氷上で2時間インキュベート後、37 °Cで代謝させたときの細胞外7-HCG累積放出量 (n=3, 平均値 \pm SD)

出する輸送蛋白質である MRP2 の阻害作用を有する化合物を候補として、UGT の阻害活性がないことを確認した。その結果、シクロスポリン A が UGT 阻害活性を有しないことが明らかとなった (図 3) そこで今後はシクロスポリン A 存在下で、同様に検討を加え、細胞内外の 7-HC と 7HCG の変化量から、UGT 活性が抱合体により阻害されるか否か明らかにしていく。

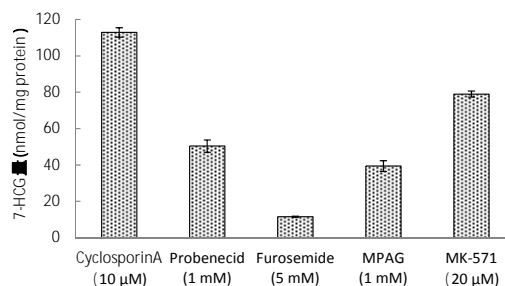


図3 LLC-PK1細胞破砕液を用いた7-HCグルクロン酸抱合反応のMRP2阻害剤の影響 (n=2, 平均値 \pm range)

(2) UGT1A9 活性に及ぼす UGT2B4 発現量の影響

一方、UGT-UGT 蛋白質間相互作用の影響を解明のためのモデルとして、ヒト肝臓中の UGT2B4 発現量が個体間で大きく異なることが報告されていることから、UGT1A9 活性に及

ばす UGT2B4 の影響を評価することとした。

MCF-7 細胞

ヒト UGT1A9 の発現が報告されているヒト乳腺癌由来 MCF-7 に UGT2B4 導入し, Shield 分子存在の有無, すなわち UGT2B4 共発現の有無が UGT1A9 代謝活性に及ぼす影響を評価した。UGT1A9 の基質とし, MPA を用い, そのグルクロン酸抱合体である MPAG の生成量を測定した。その結果, Shield 分子存在の有無で UGT1A9 活性に有意な差は認められなかった。

UGT1A9 安定発現 HeLa 細胞

次に, UGT1A9 安定発現 HeLa 細胞を用いて同様に検討した。その結果, Shield 分子非存在下である UGT2B4 発現量が抑えられている方が UGT1A9 の活性が高く, Shield 分子存在下である UGT2B4 共存時に UGT1A9 活性が低下することが示唆された (図 4)。

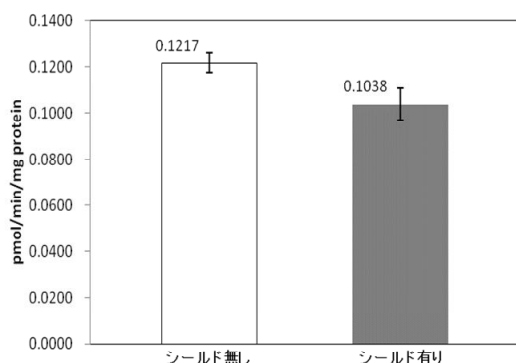


図4 UGT1A9安定発現HeLa細胞UGT2B4共発現の効果
(n=3, 平均値±SD)

MCF-7 細胞では差がなく, UGT1A9 安定発現 HeLa 細胞で影響が認められたのは, MCF-7 では UGT1A9 の発現量が少なく, 生来 MCF-7 に存在する UGT2B4 とのオリゴマー形成が飽和しているため, 導入した UGT2B4 の影響を受けにくく, 一方 UGT1A9 安定発現 HeLa 細胞では, UGT2B4 の導入により UGT1A9 と UGT2B4 のヘテロオリゴマーが形成され, それが UGT1A9 のモノマーやホモオリゴマーよりも活性が低いため, UGT2B4 の発現を抑制すると活性が上昇したと考えている。この系が UGT-UGT 蛋白質間相互作用の UGT 活性に与える影響を評価する上で有用である可能性が示されたため, 今後は UGT1A9 安定発現 HeLa 細胞を用いて, 一過性ではなく UGT2B4 in pPTUNER の安定発現細胞を作成し, 再現性の確認およびモノマーやヘテロマーなど複合体形成の種類とその割合の評価を継続して進めていく予定である。

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)

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 0件)

[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
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武隈 洋 (TAKEKUMA, Yoh)
北海道大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号: 00396293