

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 12 月 2 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460907

研究課題名(和文) 偽アルドステロン症発症リスクの個体差に関する研究と予知のための検査キットの開発

研究課題名(英文) Development of analytical kit to prevent licorice-induced pseudoaldosteronism

研究代表者

牧野 利明 (Makino, Toshiaki)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80326561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：甘草の副作用、偽アルドステロン症の原因物質として、申請者はMrp2機能不全時に血中に出現する3-モノグルクロニルグリチルレチン酸(3MGA)が原因物質であると推定している。本研究では、抗3MGA抗体を用いてその血中、尿中濃度を測定する方法を開発し、その副作用の発症を予防するためのキットの開発を目的とした。しかし、Mrp2欠損ラットに甘草由来成分であるGAを経口投与した時の血中、尿中から、その抗体と交差反応する新規GA代謝物が検出され、単離、構造を解析したところ、新規物質であるcompound 1と決定した。本化合物が3MGAに代わる偽アルドステロン症原因物質である可能性が推定された。

研究成果の概要(英文)：Licorice-induced pseudoaldosteronism is the most frequent side-effect of Kampo medicine. I expected that 3-monoglucronyl-glycyrrhetic acid (3MGA) is the genuine causative metabolite of glycyrrhetic acid to cause pseudoaldosteronism. The aim of this study is to evaluate the effectiveness of anti-3MGA antibody to measure the concentration of 3MGA in serum and urine collected from GA-treated Mrp2-deficient rats. However, I found the cross-reactivity of anti-3MGA antibody with unknown metabolite of GA in serum and urine of Mrp2-deficient rats. I isolated this unknown metabolite from the urine and determined its structure. This compound might be the genuine causative metabolite for licorice-induced pseudoaldosteronism instead of 3MGA.

研究分野：生薬学

キーワード：漢方薬 副作用 偽アルドステロン症 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病、神経性疾患やアレルギー性疾患などへの対応や、少子高齢化に伴う国民総医療費の増大、疾患の重症化を未然に防ぐための予防医学として、漢方医学が役割を果たすことが期待されている。現在では9割の医師が漢方薬の使用経験があるほか、漢方薬の有用性を明らかにするための基礎・臨床研究も盛んに行われており、漢方医学は一定のエビデンスを持った治療法として国民医療の一部を実際に担うようになってきている。

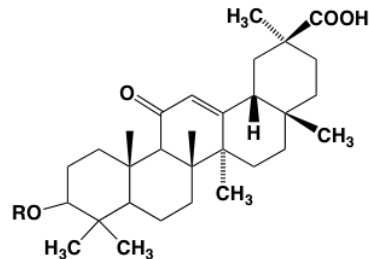
一方、漢方薬の利用拡大とともに副作用報告も増大している。漢方薬が引き起こす最も頻度の高い副作用は、医療用漢方エキス製剤の約7割に配合されている甘草が引き起こす偽アルドステロン症である。そのメカニズムは、甘草に含まれる主要な成分であるグリチルリチン (GL) の生体内における代謝物、グリチルレチン酸 (GA) が、腎尿細管細胞に発現している 11β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (11β-HSD2) を阻害し、この酵素が解毒しているコルチゾールが腎尿細管細胞内に蓄積し、それが鉱質コルチコイドレセプターに結合した結果、カリウムの尿細管分泌とナトリウムの再吸収が促進され、低カリウム血症、高血圧、浮腫、ミオパチーなどの症状が発症する、とされている。甘草による偽アルドステロン症は、甘草の服用量や期間にある程度の依存性が認められるものの、感受性の高さには個体差があるとされている。偽アルドステロン症発症は、甘草の摂取を中止すれば緩解するが、発見が遅れると重篤な状態となり、副作用をあらかじめ予防できるような診断基準や医薬品情報が臨床現場から切実に求められている。

Harahap と西尾らは、その個体差についての研究に着手し、偽アルドステロン症の原因となる 11β-HSD2 をコードする遺伝子 11βHSD2 について、偽アルドステロン症を発症した患者と発症しなかった患者との間で遺伝子配列を比較調査した結果、発症患者 15 症例中 1 例に点変異が認められたことを報告している (Harahap IS. et al., Evid. Based Complement. Alternat. Med., 2011: 646540, 2011)。しかしその確率は高くはなく、その変異が甘草に対する感受性の原因である可能性は低いと考えられる。

Kato らは、甘草により偽アルドステロン症を起こした患者 10 例と発症しなかった患者 10 例の血漿中の GL およびその代謝物濃度を測定し比較した。その結果、発症した患者の血漿では GA の他にもうひとつの代謝物である 3-モノグルクロニルグリチルレチン酸 (3MGA) を高い濃度で検出したのに対して、発症しなかった患者では発症した患者と同程度の GA の血漿中濃度を示したのに対して 3MGA は検出限界以下だったことを発見し、偽アルドステロン症発症と 3MGA との関連を推察した。

近年、さまざまな物質を細胞内外へと輸送

する各種トランスポーターの生体内における役割が明らかになってきつつある。薬物の体内動態は個人個人のトランスポーターの機能によって変化することから、患者個人のトランスポーター機能や変異をあらかじめ調査した後で薬用量を決定するオーダーメイド医療が現実化しつつあり、薬物の反応性の個体差とトランスポーターの機能との関連が注目されてきている。



グリチルリチン (GL) R = glucUA-glucUA
 3-モノグルクロニル
 グリチルレチン酸 (3MGA) R = glucUA
 グリチルレチン酸 (GA) R = H
 glucUA, glucuronic acid.

これまで申請者は、甘草含有成分 GL およびその代謝物である GA と 3MGA の体内動態と偽アルドステロン症発症の関連を研究してきた。その結果、肝線維化により肝細胞内から胆汁中へ輸送するトランスポーターのひとつである Mrp2 の発現が低下し 3MGA の胆汁排泄が抑制され、その血中濃度が増加すること (Makino T. et al. Drug Metab. Dispos. 36:1438-1443, 2008)、3MGA を血液中から腎尿細管細胞内へ輸送するトランスポーターとして有機アニオントランスポーター (OAT) 1 および 3、有機アニオン輸送ペプチド (OATP) 4C1 を同定し、それらが 3MGA の 11β-HSD2 阻害作用に強く関与することを明らかにしてきた (Makino T. et al. J. Pharm. Exp. Ther. 342: 297-304, 2012)。以上のことから、偽アルドステロン症発症の原因が 3MGA であること強く示唆されることとなった。

2. 研究の目的

3MGA の尿中・血中濃度を測定するための ELISA 法を開発し、GA を投与しきに血液中、尿中に 3MGA が出現する Mrp2 欠損ラット (EHBR) および研究協力者から提供された偽アルドステロン症発症患者の血漿または尿中に含まれる 3MGA 濃度を測定し、実際のヒトでの偽アルドステロン症の原因が 3MGA あることを実証することを第一の目的とする。さらに、その成果に基づいて、甘草による偽アルドステロン症の発症を予見するため検査キットの開発することを第二の目的とする。

3. 研究の方法

偽アルドステロン症原因物質の血中または尿中濃度測定のための ELISA の開発 GA および 3MGA を特異的に認識するモノクロー

ーナル抗体が、研究協力者の第一薬科大学森永 紀 准教授により開発されている(2012年、日本薬学会九州支部会にて発表)。この抗体を用いて、血液または尿中に存在する3MGA 濃度の定量により、事前に偽アルドステロン症発症を予防することが可能になると推測されている。

そこで、3MGA の血中および尿中濃度を測定するための ELISA を確立する。正常ラットおよび 3MGA を体内に蓄積する EHBRs に GA を経口投与し、経時的に血液と尿を採取する。得られた血液および尿を、従来通りの LC/MS/MS とこの抗体を利用した ELISA 法とで同時に GA および 3MGA 濃度を選択的に定量できる条件を求める。

その際、抗体が GA を投与した EHBR より採取した血清又は尿中出现する GA 代謝物と交差反応して正確に 3MGA の濃度が測れない時は、生体試料と同抗体を用いたイースタンプロット法を用いて交差反応を示す化合物を検出し、その陽性反応を利用して EHBR から採取した尿中からその代謝物を単離、同定する。

4. 研究成果

濃度既知の 3MGA を含む正常ラット血漿及び尿から、3MGA 濃度を ELISA および LC/MS/MS で測定した場合、尿を ELISA で測定した時に測定値がやや設定濃度よりも低く検出される傾向があったものの、測定方法の違いにより測定値に差は認められなかった。このことから、正常ラット血漿および尿に普遍的に含まれている化合物は、抗 3MGA 抗体と交差反応することはなく、LC/MS/MS および ELISA とともに共通して血漿中および尿中の 3MGA 濃度を正確に測定することができることが期待された。

次に、GA を単回投与した EHBR から経時的に採取した血漿および尿中の 3MGA 濃度を、ELISA および LC/MS/MS それぞれで定量したところ、ELISA により得られた血漿中濃度および尿中 3MGA 累積排泄量の時間推移曲線は、LC/MS/MS により得られた結果と形状が類似していた。このことから、GA 経口投与後の EHBR から採取した血漿中および尿中の 3MGA 濃度測定が可能であることが強く示唆された。しかし、ELISA で測定した血中 3MGA 濃度、尿中 3MGA 排泄量は、LC/MS/MS で測定した結果と比較して、それぞれ 100 倍、10 倍程度の値を示した。このことから、ELISA による 3MGA 濃度測定の定量性に疑問が生じた。

そこで、GA を投与した EHBR の尿をイースタンプロット法で分析したところ、イースタンプロットの結果から、GA 経口投与後の EHBR から採取した尿サンプル中に、3MGA よりも極性の高いと予想される領域に、抗 3MGA 抗体と交差反応する物質が存在することが示された。また、尿サンプルで 3MGA のスポットがほとんど確認できなかったこ

とから、この物質は 3MGA よりも尿中量が多いか、より強く抗体と反応することが示唆された(図 1)。

そこで、GA を連続経口投与した EHBR の尿を集め、各種クロマトグラフィーにより分画を行い、抗 3MGA 抗体と反応する 3MGA ではない未知物質を単離した。その物質を ^1H および ^{13}C -NMR および MS スペクトルを解析し、新規物質である compound 1 と同定した。Compound 1 は、GA よりは 118HSD2 阻害作用は弱かったものの、GL と同等の阻害作用を示した。

Compound 1 は、まだ知られていない GA の代謝物であり、また 3MGA に代わる真の偽アルドステロン症原因物質である可能性がある。今回の研究では、当初の目的であるその発症を予防するための検査キットの開発までは至らなかったが、今後、compound 1 の偽アルドステロン症発症への寄与を解析することにより、この抗 3MGA 抗体が偽アルドステロン症発症の予防に貢献するものと考えられた。

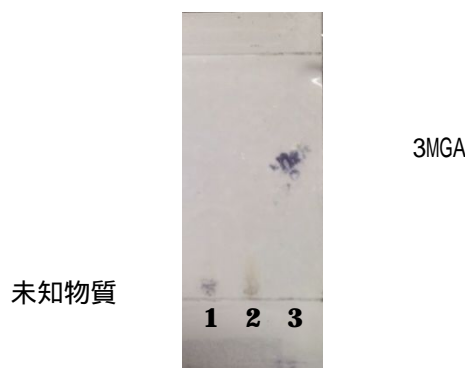


図 GA 投与して 48 時間後の EHBR から採取した尿からの抗 3MGA 抗体を用いたイースタンプロット

順相 TLC 板に、1: 尿(ラット 1) 10 μL 、2: 尿(ラット 2) 10 μL 、3: 3MGA の標準溶液(5 mg/mL) 2 μL をスポットし、 $\text{H}_2\text{O}/\text{BuOH}/\text{AcOH}$ 混合液(5:4:1)で 8 cm 程度展開した。それを PES 膜に転写し、抗 3MGA 抗体を用いて発色させるイースタンプロット法を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Toshiaki Makino, 3-Monoglucuronoyl glycyrrhretinic acid is a possible marker compound related to licorice-induced pseudoaldosteronism Biol. Pharm. Bull. 37(6): 898-902, 2014

〔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〕

ホームページ等は、今後、さらなる研究成果が得られたときに掲載を検討する。

6. 研究組織

(1)研究代表者 牧野利明(Toshiaki Makino)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：80326561

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 森永 紀(Osamu Morinaga)

第一薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60465771