

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：32525

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590206

研究課題名(和文) プロドラッグの構造と関連した活性化酵素の探索と組織特異的発現の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the tissue-specific expression of the hydrolases which enzymes related to structure activity relationship of pro-drugs

研究代表者

細川 正清 (Hosokawa, Masakiyo)

千葉科学大学・薬学部・教授

研究者番号：70181500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、carboxylesterase (CES)、butyrylcholinesterase (BuChE)、arylaceta-
mido deacetylase (AADAC)、cholesteroeesterase(およびparaoxonase (PON)によるプロドラッグの代謝活性化の寄与を
調べると共に臓器特異的発現機構について解明し、プロドラッグの代謝活性化モデル細胞を作成することを目的として
研究を行った。この研究により、臓器を特定したプロドラッグの効率的な開発や臨床において安全性や有効性を踏まえ
たプロドラッグの適切な使用法を開発することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Human carboxylesterase (CES), butyrylcholinesterase (BuChE), arylacetamido
deacetylase (AADAC), cholesteroeesterase(ChIE) and paraoxonase (PON) efficiently catalyze the hydrolysis
of a variety of ester- and amide-containing chemicals as well as drug to the respective free acid. These
hydrolases catalyze the hydrolysis of the different structure of clinically used pro-drugs. In this
study, we investigated the tissue specific expression and the structure activity relationship of
pro-drugs of these hydrolase enzymes.

研究分野：薬物代謝学

キーワード：カルボキシルエステラーゼ プロドラッグ 代謝活性化 AADAC

1. 研究開始当初の背景

CES は、エステルやアミド結合を有する化合物を効率良く加水分解することから、近年バイオアベイラビリティの改善や副作用の軽減を目的として開発されてきたプロドラッグの代謝活性化において、極めて重要な役割を果たしている。申請者は、これまでラット、ビーグル犬、カニクイザルなど 10 種の哺乳動物およびヒトより 25 種のエステラーゼアイソザイムの精製を行い、プロドラッグの代謝活性化能の種差を明らかにした。さらに、実験動物およびヒト CES の cDNA を導入した異種細胞発現系を作成することにより、プロドラッグをはじめとする薬物の加水分解代謝の差異が、アイソザイムのアミノ酸配列の違いに基づくことを明確にしてきた (Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol., 38, 257, 1998, Chem. Biol. Interact, 162,195- 2006, Drug Metab Rev, 39, 1-15, 2007, Molecules 13, 412-31, 2008)。特にヒトにおいては、主要なアイソザイムである CES1 ファミリーと CES2 ファミリーの間にプロドラッグの構造に基づいた明確な基質特異性の差異があることを明らかにしてきた (Drug. Metab. Dispos., 30,488-, 2002, Biochem Pharmacol 69,1287-,2005, Drug.Metab.Dispos., 34,1734-, 2006, Chem Biol Interact, 162,195- 2006, Molecules 13, 412-31, 2008 Drug Metab Dispos, 37, 315-321,2009)。例えば CES1 に高い特異性を示す基質として oseltamivir, meperidine, methylphenidate, temocapril, delapril, cocaine(methylester) など、いずれの場合もアルコール置換基よりもアシル置換基の方が、かさ高い基質である。これに対し、CES2 に特異性の高い基質は CES1 とは逆に、抗癌剤である CPT-11 (塩酸イリノテカン) をはじめとし heroin、cocaine (benzoyl-ester)、methylprednisolone 21-hemisuccinate のようにアルコール置換基の方がかさ高い基質であることが示された。この研究の中でヒトにおけるそれぞれの臓器における発現は、アイソザイム間で明確な差異があることを明らかにしており、例えば肝臓、肺や脳では主に CES1 が発現しているが、小腸や腎臓では CES 1 は発現しておらず CES2 のみが発現しているなど、臓器特異的発現に差異があることを示しており、プロドラッグ創薬において代謝臓器を目指した設計が可能となるなど意義が大きいものと考えられるが、臓器特異的発現調節機構に関しては後述するように一部分

しか解明されていない。

一方、CES の発現調節機構に関しては、これまで申請者は CES2 ファミリーのアイソザイムが、転写因子である Sp1 や USF1 により協調的な制御により発現調節されていることや (Biochem J, 384, 101- 2004)、核内受容体である HNF-4 により発現調節されていること、さらには、この CES が胆汁酸-FXR-SHP により抑制的な制御をうけていることなど (Arch Biochem Biophys 447,107-, 2006) これまで全く報告されていなかった CES の発現調節機構を明らかにしてきた。一方、申請者はヒト肝の主要なアイソザイムである CES1A の遺伝子には、tail-to-tail で向かい合っている CES 1A1 と 1A2 の 2 つの遺伝子が存在すること。CES 1A1 のプロモーター領域に存在する Sp1 と C/EBP の転写因子結合配列の差異が、実際の転写因子の結合および転写活性に影響を及ぼしていることを見出し、肝における発現量の差異がこの領域の塩基配列に起因していることを明らかにした (Drug Metab Pharmacokinet. 23, 73-84, 2008, Molecules 13, 412-31, 2008)。また、これらの遺伝子の転写産物である 2 種のエステラーゼの細胞内局在性が異なることも明らかにした (J. Pestic.Sci, 35(3), 229-239 (2010))。ところで、この CES1A は前述したように肝臓のほか肺や脳毛細血管内皮細胞にも発現しているが、興味深いことに小腸上皮粘膜細胞および腎臓には発現していないことを、報告してきた (Molecules 13, 412-31, 2008)。CES の臓器特異的発現は、生体内での代謝活性化部位を特定できるため、プロドラッグ創薬においては極めて重要な意味を持つ。最近、申請者らはヒトの肝臓と腎臓における CES1A1 アイソザイムの臓器特異的発現について DNA メチル化が関与していることを初めて明らかにした (Xenobiotica. 40:119-28. 2010)。この研究は、CES 遺伝子が TATA-less プロモーターで発現調節が行われていること、CpG アイランドが発現調節領域にあることに着目し DNA メチル化と発現の関係について検討し、DNA メチル化と CES の発現の関係を初めて明確にした論文で、プロドラッグ創薬において応用価値が高いものと考えられる。しかしながら、ラット、ビーグル犬やカニクイザルでは CES の臓器特異的発現の原因は未だに解明されていない。これらを背景として、本実験はスタートした。

2. 研究の目的

これまで特異抗体や阻害剤を用いたプロドラッグの代謝活性化の寄与率を求める実験から、上記 CES 以外の加水分解酵素によるプロドラッグの活性化の可能性

について示唆する結果を得てきた。プロドラッグの開発においてCESの臓器特異的発現も重要であるが、これまで明らかになっていない他の加水分解酵素であるbutyrylcholinesterase (BuChE), arylacetamidodeacetylase(AADAC),Cholesterolesterase(CholE)や paraoxonase (PON)等について、各臓器での発現量やプロドラッグの代謝活性化能に関しては詳細な検討が行われていないのが現状である。さらに、プロドラッグの開発において実験動物種間での臓器特異的発現が異なっているため、薬物動態試験において実験動物のデータを単純にヒトに外挿することが出来ないという問題が起こっている。このことに関しては、動物種間での基質特異性の差異および臓器特異的発現の差異が大きな原因であると考えられている。

そこで、本研究においてはヒトと実験動物種間での臓器特異的発現調節機構を調べるため、ヒトのCESと発現しているアイソザイムの種類や構成が類似している、カニクイザルおよびビーグル犬を用いることとする。また、CES以外の代謝活性化酵素であるBuChE,AADAC,CholEおよびPONに関しても、BuChEとPONに関しては血漿での発現、AADACおよびCholEに関しては臓器特異的発現のヒトと実験動物間での差異を調べる。

このように本研究を推進することによりプロドラッグの体内動態の予測に必要な情報を得るとともに、臓器差を踏まえた新規プロドラッグの効率的な開発につながるものと考えられる。さらに、実験動物およびヒトの臓器差を予測した代謝モデル系を作成することで、効率的なプロドラッグ創薬が可能となる。加水分解酵素とトランスポーターを同時に発現させたプロドラッグのモデル細胞系を構築する。これらの研究により迅速なプロドラッグの開発への応用が期待されると共に、臨床において安全性や治療の効率を目的としたプロドラッグの適切な使用法を開発することが可能となる。

3. 研究の方法

ヒトに関しては、特定非営利活動法人エイチ・エー・ビー研究機構(HAB研究機構)よりすでに入手済のヒトの各組織の検体を用いて、CES1A1, CES1A2, CES2A1, CES3, AADAC, BuChE, CholE, PON1, PON2 およびPON3のそれぞれの酵素に特異性の高い基質を用いて酵素活性を測定すると共に

それぞれのmRNAをリアルタイムPCR法により測定する。カニクイザルおよびビーグル犬に関しては市販の臓器を用いて、CES,AADAC,BuChE,CholE,およびPONのそれぞれの酵素に特異性の高い基質を用いて酵素活性を測定すると共にそれぞれのmRNAをリアルタイムPCR法により測定した。

これまでの検討により小腸上皮粘膜および腎臓には発現していないことが明らかとなった(Molecules 13, 412-31, 2008)。そこで、ヒト腎由来細胞であるHEK293についてDNA阻害剤である5-aza-dCを添加したところ、mRNA量とエステラーゼ酵素活性が著しく上昇し、さらにヒストン脱アセチル化阻害剤であるtrichostatinA(TSA)の添加により、肝由来細胞であるHuH7細胞と同等のmRNAの発現がみられた。さらにDNAメチル化についてbisulfate sequence法により、DNAメチル化の部位を調べたところ転写開始点近傍のCpGアイランドのメチル化が発現に関与していることが明らかとなった(Xenobiotica. 40:119-28. 2010)。そこで、本研究においては小腸についてもCell Systems社 正常ヒト小腸上皮細胞(CS-ABI-519)についても5-aza-dCの細胞への添加、bisulfate sequence、real-time PCRおよび酵素活性の測定および組織を用いることにより、腎臓と同様な方法で、DNAメチル化が関与しているかどうか調べた。

4. 研究成果

ヒトCES1A1, CES1A2, CES2A1, AADAC, BuChE, PON1について、cDNAクローニングを行ってcDNAを昆虫細胞であるSf9またはヒト腎由来細胞であるHEK293に導入した異種細胞発現系を作成して、temocapril, CPT-11 methylprednisolone 21-hemisuccinateを初めとした临床上重要なプロドラッグについて代謝活性化能を調べた。その結果、アイソザイムや酵素により代謝活性化能が大きく異なることが明らかとなった。さらに特定非営利活動法人エイチ・エー・ビー研究機構(HAB研究機構)よりすでに入手済のヒトの各組織の検体を用いて、CES1A1, CES1A2, CES2A1, CES3, AADAC, BuChEについてそれぞれの酵素に特異性の高い基質を用いて酵素活性を測定すると共にそれぞれのmRNAをリアルタイムPCR法により測定した。その結果、mRNA発現量と酵素活性の間には大きな相関関係が認められた。

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 件)

Uno Y, Hosokawa M, Imai T. Isolation and characterization of arylacetamide deacetylase in cynomolgus macaques. J Vet Med Sci. 2015 Feb 7. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25715734.

Uno Y, Uehara S, Hosokawa M, Imai T. Systematic identification and characterization of carboxylesterases in cynomolgus macaques. Drug Metab Dispos. 2014 Dec; 42(12):2002-6.

3. Suzaki Y, Uemura N, Hosokawa M, Ohashi K. Gly143Glu polymorphism of the human carboxylesterase1 gene in an Asian population. Eur J Clin Pharmacol. 2013 Mar;69(3):735-6.

4. Suzaki Y, Uemura N, Takada M, Ohyama T, Itohd A, Morimoto T, Imai H, Hamasaki H, Inano A, Hosokawa M, Tateishi M, Ohashi K. The effect of carboxylesterase 1 (CES1) polymorphisms on the pharmacokinetics of oseltamivir in humans. Eur J Clin Pharmacol. 2013 Jan;69(1):21-30.

Hori T, Jin L, Fujii A, Furihata T, Nagahara Y, Chiba K, Hosokawa M. Dexamethasone-mediated transcriptional regulation of rat carboxylesterase 2 gene. Xenobiotica. 2012 Jul;42(7):614-23.

〔学会発表〕(計 2件)

Hosokawa Masakiyo, Hori Takeshi. Matsuanga Tamihide, Ohmori Shigeru

Dexamethasone mediate transcriptional regulation of carboxylesterase 1A1 gene in human fetal liver cells

19th North American ISSX Meeting and 29th JSSX Annual Meeting, Hilton San Francisco, San Francisco, California, USA, 2014-10

溝井健太、青木隆、馬島友、小澤拓未、高橋正人、巾正美、細川正清

アトルバスタチンのプロドラッグ化研究
日本薬学会第135年会、神戸、2015年3月

〔図書〕(計 2件)

細川正清: 5章-5 酵素誘導実験 薬剤学実験法必携マニュアルII 生物薬剤学(日本薬学会編集委員会編), 南江堂、東京 179-193、2014.4

細川正清: 9章 1-5 異物代謝に影響を及ぼす因子 衛生薬学-健康と環境-(永沼章、姫野誠一郎、平塚明編) 丸善出版、東京 372-380、2014.3

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

細川正清 (HOSOKAWA Masakiyo)

千葉科学大学・薬学部薬学科・教授

研究者番号：70181500

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：