

令和元年5月23日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08367

研究課題名(和文)薬の副作用発現に関与するヒト還元酵素の同定および機能解析

研究課題名(英文)Elucidation of reductases related with side effects of clinical drugs

研究代表者

深見 達基 (Fukami, Tatsuki)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：00532300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ニトロ基の還元反応が肝障害などの副作用に関連することが示唆されていたニトラゼパムの還元酵素をヒト肝臓より精製した結果、アルデヒドオキシダーゼ1(AOX1)が単離された。また、本酵素の還元酵素活性は生体内物質N-メチルニコチンアミド存在下で著しく上昇した。還元反応の中間体として不安定であるN-ヒドロキシアミンが生成することを明らかにし、これが副作用発現に関与することが示唆された。AOX1がどのようなニトロ基含有医薬品を還元するのか解析した結果、ダントロレンやフルタミドなど、ニトロ基の電子密度が比較的低く、臨床で還元体生成が認められ、かつ肝障害が副作用として報告されているものが該当した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医薬品開発において、薬物動態の理解が進んでいるため薬物間相互作用が原因となり候補化合物がドロップアウトする例は減少したものの、医薬品毒性に関しては情報不足の点からドロップアウトの原因として未だ横ばいである。本検討では、副作用発症メカニズムを明らかにする目的でニトロ基還元反応に注目し、医薬品のニトロ基還元酵素としてアルデヒドオキシダーゼ(AOX1)を単離、同定した。また、AOX1による還元体が副作用発現に関与することも示唆された。どのような化学構造のニトロ基含有医薬品がAOX1により還元されるか明らかにした点から、創薬において副作用を回避するための有用な情報を提供できたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Enzyme responsible for reduction of nitrazepam, which causes hepatotoxicity as a side effect, was purified from human liver, resulting in the isolation of aldehyde oxidase 1 (AOX1). Nitrazepam reductase activity was enhanced in the presence of N-methylnicotinamide, which is an endogenous substrate of AOX1. In the process of reduction, nitrazepam was converted to N-hydroxyl amine form, which has been accepted to related with several toxicity because of its instability. This unstable intermediate may cause hepatotoxicity by nitrazepam. It was investigated which compounds were reduced by AOX1 in human, resulting that some compounds reported to cause hepatotoxicity as a side effect, including dantrolene and flutamide, were reduced by AOX1. Common characteristics among them were to possess relatively electron-deficient nitro group.

研究分野：薬物代謝

キーワード：薬物代謝反応 還元反応 医薬品毒性 ニトロ基含有酵素 Non-P450

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臨床で使用されている薬の多くは生体内で酸化、還元、加水分解等の代謝反応を受ける。いずれも一般に解毒反応として捉えられているが、ときに毒性を発揮する代謝物を産生する場合がある。その反応を担う酵素の研究は主に酸化反応を触媒するシトクロム P450 に注目して行われてきたが、近年、製薬企業では副作用の回避を目的として P450 により代謝を受けない薬を開発する傾向があり、P450 以外の酵素(non-CYP)の情報が求められている。

申請者はこれまで加水分解反応を触媒する酵素に注目し、機能が未解明であったアリルアセタミドデアセチラーゼ(AADAC)や α/β ヒドロラーゼドメインコンテイング 10 が臨床で使用されている医薬品の加水分解反応を担っており、副作用発現に関与することを数多く報告してきた。

還元反応も医薬品の副作用の惹起に関与することが示唆されている。例えば、筋弛緩薬ダントロレンは副作用として肝障害が知られており、米国 Food and Drug Administration (FDA)において最も危険度の高い black box warning に分類されている。睡眠導入薬ニトラゼパムも副作用として肝障害と催奇形性が報告されている。いずれも構造内にニトロ基を有しており、生体内でアリルアミンに還元されることが毒性発症につながる可能性が示唆されている。しかし、還元酵素の実体が捉えられていないこともあり、還元反応と毒性との関連が実験的に証明された例はない。還元酵素には aldo/keto-reductase (AKR)ファミリーや carbonyl reductase (CR)ファミリー、NADPH-quinone oxidoreductase (NQO)、NADPH-P450 oxidoreductase 等、数多く存在するが、それぞれの酵素の基質特異性や特異的阻害剤についての情報が乏しいため、責任酵素を同定する手段がない。また、還元反応は一般に嫌気性条件下で起こるため、嫌気性環境での *in vitro* 試験が行われており、薬物代謝の主要臓器である肝臓等で起こるような好気的条件下での反応について、ほとんど検討されていない。

2. 研究の目的

薬の還元反応が毒性発現に関わっているか明らかにするために、ヒト肝臓における薬物毒性関連還元酵素を同定し、その機能的特徴付けを行い、毒性回避に必要な情報を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

対象化合物として毒性発症に対し還元反応の関与が示唆されていたニトラゼパムを用いた。薬物代謝の主要臓器であるヒト肝臓よりミクロソームおよびサイトゾル画分を調製し、ニトラゼパムの還元反応を担う酵素を精製した。硫安分画、イオンクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等を組み合わせ、LC-MS/MS により測定した酵素活性を指標に精製ステップを進めた。精製フラクションのバンドパターンより過去の報告からタンパク質を推測し、そのタンパク質がニトラゼパム還元酵素であるか明らかにするためにバキュロウイルス発現系を作成して、酵素活性を測定した。

同定した酵素がニトラゼパムの他にどのようなニトロ基含有医薬品を還元するか、13 種のニトロ基含有医薬品の還元酵素活性をヒト肝臓画分および精製酵素を用いて解析した。酵素活性を測定する際に必要な代謝物の標品は、購入できない場合、 SnCl_2 などを用いて化学的に還元し、精製することにより得た。

同定した還元酵素が生体内で薬物の毒性発現に関与しているか、様々な系統のマウスやラットを用いて検討した。薬物代謝酵素には種差が認められるため、当該還元酵素が実験動物でも機能的に働くか、まずは肝臓画分を調製し、*in vitro* にて酵素活性を測定した。

4. 研究成果

ニトロ基の還元反応が肝障害などの副作用に関連することが示唆されていたニトラゼパムの還元酵素活性をヒト肝臓ミクロソームおよびサイトゾルを用いて測定したところ、ヒト肝臓サイトゾルにおいてミクロソームよりも高い値で認められた。この酵素活性は様々な還元酵素の補酵素である Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)を添加しても上昇が認められなかったため、AKR や CR ファミリー、NQO や NADPH-P450 oxidoreductase の関与は否定された。そこで、ヒト肝臓サイトゾルより還元酵素を精製した結果、アルデヒドオキシダーゼ 1(AOX1)が単離された。以前、AOX1 は環境汚染物質である 1-ニトロピレンや 3-ニトロフルオランセンのニトロ基を還元することが報告されており、その反応は AOX1 の内因性基質である N-メチルニコチンアミドにより上昇することが報告されていた。そこで、ヒト肝臓サイトゾルに N-メチルニコチンアミドを添加し、ニトラゼパム還元酵素活性を測定したところ、著しい活性の上昇が認められた。以上より、ニトラゼパムの還元酵素として AOX1 が明らかにされた。

ニトロ基含有医薬品は還元反応によりアミノ体に変換され、さらに P450 により酸化反応を受けて不安定な反応性代謝物 N-ヒドロキシアミンが生成する、この一連の代謝反応がニトロ基含有医薬品の毒性発現メカニズムとして考えられていた。AOX1 がニトロ基を 2 電子還元様式

で還元反応を触媒するのであれば、アミノ体への還元過程で N-ヒドロキシアミンが生成する。そこで直接 N-ヒドロキシアミンが生成するのか調べるため、この代謝物をトラップするグルタチオンもしくは N-アセチルシステインを反応系に添加して還元酵素活性を測定した。その結果、ヒト肝臓サイトゾルにおいて N-メチルニコチンアミド存在下でニトラゼパムより N-ヒドロキシアミンの生成が認められた。よって、P450 による代謝反応を受けなくとも、AOX1 のみで反応性代謝物へ変換されることが示された。以上の一連の代謝反応はニトラゼパムのみならずダントロレンにおいても認められた。

AOX1 がどのようなニトロ基含有医薬品を還元するのか明らかにするために、ニトラゼパムとダントロレン以外の 11 個のニトロ基含有医薬品の還元酵素活性をヒト肝臓サイトゾルおよびヒト AOX1 発現系を用いて測定した。その結果、肝障害が副作用として報告されており、かつ臨床において血中でアミノ体の検出が認められているクロナゼパムやフルタミドにおいてヒト肝臓サイトゾルでも AOX1 発現系でも還元酵素活性が認められ、アミノ体検出の報告がないアゼニジピンやニフェジピンでは両者で認められなかった。化学構造の観点からは、ニトロ基の電子が比較的欠乏している化合物ほど AOX1 により還元反応を受ける性質が見受けられた。

AOX1 が生体内でニトロ基含有医薬品の毒性発現に関与しているか調べるために、様々な系統のマウスやラットの肝臓サイトゾルを調製してニトラゼパムやダントロレン還元酵素活性を測定したが、いずれにおいても活性は認められなかった。よって、AOX1 の還元酵素活性には大きな種差が存在することが明らかになった。これが医薬品毒性評価時の大きな支障となるかもしれない。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Takuo Ogiso, Tatsuki Fukami, Kenji Mishiro, Keigo Konishi, Jeffrey P. Jones, and Miki Nakajima. Substrate selectivity of human aldehyde oxidase 1 in reduction of nitroaromatic drugs. *Archives of Biochemical Biophysics* 659: 85-92, 2018.
2. Takayuki Amano, Tatsuki Fukami, Takuo Ogiso, Daisuke Hirose, Jeffrey P. Jones, Tsuyoshi Taniguchi, and Miki Nakajima. Identification of enzymes responsible for dantrolene metabolism in the human liver: a clue to uncover the cause of liver injury. *Biochemical Pharmacology* 151: 69-78, 2018.
3. Keigo Konishi, Tatsuki Fukami, Saki Gotoh, and Miki Nakajima. Identification of enzymes responsible for nitrazepam metabolism and toxicity in human. *Biochemical Pharmacology* 140:150-160, 2017.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 深見達基 医薬品毒性に対する non-P450 代謝の寄与 シンポジウム 第 1 回医薬品毒性機序研究会 2019 年 1 月 11 日 名古屋
2. 深見達基 薬物代謝酵素の医薬品毒性および動態における新規機能解明 シンポジウム 日本薬学会北陸支部 第 130 回例会 2018 年 11 月 18 日 富山
3. 深見達基 医薬品毒性および動態理解を目指した non-CYP 薬物代謝酵素の新規機能解明 シンポジウム 日本薬物動態学会第 33 回年会/MDO 第 22 回シンポジウム国際合同学会 2018 年 10 月 2 日 金沢
4. 小木曾巧朗、深見達基、三代憲司、小西慶吾、Jeffrey P. Jones、中島美紀 肝障害回避を目指したヒトアルデヒドオキシダーゼが還元するニトロ基含有薬物の構造学的特徴の解析 ポスター 第 45 回日本毒性学会学術年会 2018 年 7 月 18-20 日 大阪
5. 小木曾巧朗、深見達基、三代憲司、小西慶吾、Jeffrey P. Jones、中島美紀 ニトロ基含有薬物の還元反応を触媒するヒトアルデヒドオキシダーゼの基質認識性 ポスター 日本薬学会第 138 回年会 2018 年 3 月 25-28 日 金沢
6. 深見達基 Roles of hydrolase and aldehyde oxidase in controlling of pharmacokinetics and drug toxicity シンポジウム 日本薬物動態学会第 32 回年会 2017 年 12 月 1 日 東京
7. 深見達基 Non-P450 の基礎から最新知見まで ランチョンセミナー 日本薬物動態学会第 32 回年会 2017 年 11 月 30 日 東京
8. 深見達基、天野貴之、後藤紗希、廣瀬大祐、谷口剛史、中島美紀：ダントロレンの代謝酵素と肝障害の原因と考えられる反応性代謝物の生成経路の解明 ポスター 第 44 回日本毒性学会学術年会 2017 年 7 月 10 日 金沢
9. 天野貴之、深見達基、後藤紗希、中島美紀 肝障害機序解明に向けたヒト肝臓におけるダントロレン代謝酵素の同定 口頭 日本薬学会北陸支部第 128 回例会 2016 年 11 月 27 日 金沢
10. 小西慶吾、深見達基、後藤紗希、中島美紀 肝障害および催奇形性発症機序の解明に向けたニトラゼパム代謝酵素の同定 口頭 日本薬学会北陸支部第 128 回例会 2016 年 11 月 27 日 金沢

11. 天野貴之、深見達基、小西慶吾、後藤紗希、中島美紀 ヒト肝臓におけるダントロレンからのアセチルアミノダントロレン生成に關与する酵素の同定 ポスター 日本薬物動態学会第31回年会 2016年10月13日 松本
12. 小西慶吾、深見達基、後藤紗希、中島美紀 副作用発症メカニズム解明の手がかりとなるニトラゼパム代謝酵素の同定 ポスター 日本薬物動態学会第31回年会 2016年10月13日 松本

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。