

研究種目：基盤研究 (C)	
研究期間：2007～2008	
課題番号：19590147	
研究課題名 (和文)	医療麻薬適正使用の基盤：遺伝的多型に依存しないモルヒネ活性代謝物生成の個体差
研究課題名 (英文)	Basic Studies on the appropriate usage of clinical narcotics: the individual differences in the formation of morphine active metabolite which is not dependent on the genetic polymorphism
研究代表者	
	石井 祐次 (ISHII YUJI)
	九州大学・大学院薬学研究院・准教授
	研究者番号：90253468

## 研究成果の概要：

ヒトにおいてモルヒネ活性代謝物の生成に関与する UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) は主に UGT2B7 と考えられている。研究代表者らは、シトクロム P450 (CYP) 3A4 と UGT2B7 のタンパク質間相互作用により、UGT2B7 によるモルヒネのグルクロン酸抱合の位置選択性が変化することを報告している。本研究では、(1)：抗 CYP3A2 抗体により、CYP3A2 と共免疫沈降した UGT が、触媒活性を示すことを明らかにした (DMPK 誌)。これにより、CYP による UGT 活性の調節が動物種を超えて見出される現象であることを示唆した。このことは、本研究の主題である、CYP 含量の個体差が UGT の遺伝的多型に依存しないモルヒネ抱合活性の個体差の要因であるとする作業仮説を支持するものである。内因性低分子化合物による調節も、UGT の遺伝的多型に依存しない個体差の要因になる可能性がある。(2)：CYP3A4 上の相互作用に関与する領域として、J-helix 領域あるいは、その周辺領域が関与することを見出し報告した (Mol. Pharmacol. 誌)。さらに、UGT 側の相互作用部位についても、基礎的な検討を行った。(3) 一方、転移性肝臓癌摘出時にセーフティマージンとして得られた正常肝組織を用いて、CYP 含量の個体差が UGT の遺伝的多型に依存しないモルヒネ抱合活性の個体差の要因であるとする作業仮説の検証を試みた。しかし現時点では、十分な例数がなく、更に例数を集める必要がある。更に、環境因子による個体差、個体内変動についても基礎的な検討を行った。(4)：アデニンヌクレオチド類が UGT 活性の抑制的調節因子であることを見出した (BBA 誌)。アデニンヌクレオチドは、モルヒネ活性代謝物生成に関与する UGT2B7 の活性も阻害することが分かった。(5) 研究代表者らは、これまでに、脂肪酸アシル CoA が、UGT の内因性活性化因子であることを報告している。本研究では、アシル CoA レベルの変動が、モルヒネのグルクロン酸抱合活性にも影響することを、ラットを用いた基礎的な検討から示唆した。ところが、ヒト肝マイクロゾームを用いた場合は、アシル CoA による活性化作用が観察される個体がある一方、多くの個体で活性化が認められない結果となった。この不一致の原因を精査したところ、アシル CoA によるマイクロゾームの UGT 活性化には可塑性があることが明らかになり、ヒト肝組織凍結融解後のマイクロゾーム調製により、活性化作用が消失することが原因であると示唆された。これらのことから、アシル CoA は、動物種、UGT 分子種を超えた UGT の調節因子であり、UGT の遺伝的多型に依存せずに、モルヒネ活性代謝物の生成の個体差、個人内変動に関与する可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000 円	630,000 円	2,730,000 円
2008年度	1,500,000 円	450,000 円	1,950,000 円
総計	3,600,000 円	1,080,000 円	4,680,000 円

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：薬物代謝学

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトにおいてモルヒネ活性代謝物の生成に関与する UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) は主に UGT2B7 と考えられている。モルヒネの鎮痛作用には著しい個体差があることが知られている。これまで、UGT2B7 や  $\mu$ -opioid receptor の遺伝的多型などの報告はあるものの、個体差を十分に説明できる状況にはない。一方、研究代表者らは、シトクロム P450 (CYP) 3A4 と UGT2B7 のタンパク質間相互作用により、UGT2B7 によるモルヒネのグルクロン酸抱合の位置選択性が変化することを報告している。このことから、UGT2B7 の遺伝的多型に依存しない個体差のメカニズムが存在する可能性があり、本研究を着想し、開始するに至った。

## 2. 研究の目的

CYP3A4-UGT2B7 相互作用および、環境因子としての内因性調節因子の影響について詳細に検討することにより、UGT2B7 の遺伝的多型に依存しない個体差のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

CYP-UGT 相互作用の普遍性：CYP3A-UGT 相互作用が動物種を超えた普遍的なものであることを明らかにするために、ラットを用いて免疫沈降法で検討した。また、免疫沈降に CYP 分子種特異的抗体を用いることにより、CYP-UGT 相互作用の CYP 分子種特異性を検討した。さらに、CYP-UGT 複合体に活性が存在することを明らかにするために、免疫沈降物に活性が存在するか検討した。

CYP3A4-UGT2B7 相互作用に関与する領域：GST-CYP3A4 (Tyr25-Ala503) および GST-CYP3A4 (Met145-His267) を大腸菌に発現させ、これらが UGT2B7 と架橋を形成し得るか EDC を用いて検討した。2) 抗 CYP3A 抗体#1 および抗 CYP3A 抗体#2 を用いて可溶性ヒト肝臓マイクロゾームから免疫沈降を行ったとき、#2 抗体は CYP3A4 と UGT2B7 を共免疫沈降出来るのに対し、#1 抗体は CYP3A4 のみ沈降する性質を有する。また、#2 抗体は CYP3A4-UGT2B7 の EDC による架橋体を認識しない特徴がある。#1 抗体は、CYP3A4 上の UGT2B7 との相互作用部位を認識する性質を有すると示唆されるため、エピトープマッピングを行った。組み換え精製 CYP3A4 をギ酸分解し、その断片を#1 および#2 抗体で Western blot し、#1 抗体でのみ認識された断片の N 末端アミノ酸配列を決定した。こ

れによって、絞り込まれた領域のペプチドライブラリーを受託合成し、SPOTs 解析を行った。

環境因子の影響：UGT の遺伝的多型に依存しない内因性活性調節因子について検討した。特に、新たに見出した抑制的調節因子アデニンヌクレオチド類と、活性化因子、脂肪酸アシル CoA について検討した。

ヒト肝臓マイクロゾームのモルヒネ抱合活性

インフォームドコンセントにより同意を得た転移性肝臓癌の患者様より、癌部摘出時にセーフティマージンとして止むを得ず切除される正常組織を用いてマイクロゾームを調製し活性を測定した。また、血液より白血球を得て、DNA を単離し UGT2B7 の既知の遺伝的多型について調べた。

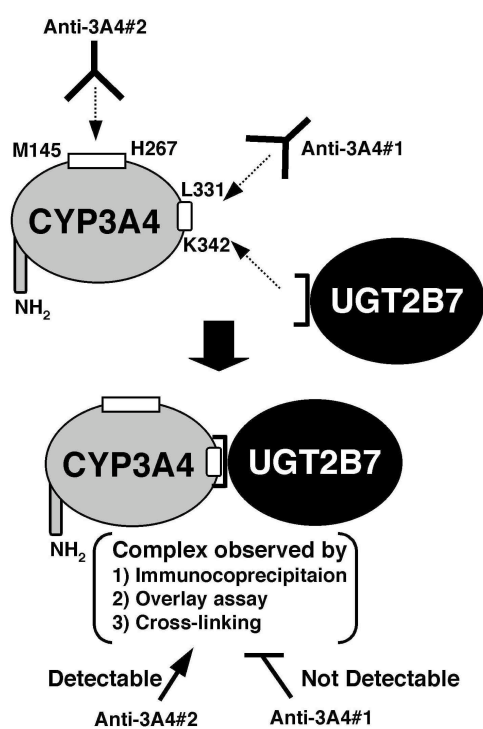
内因性低分子化合物による UGT 活性の調節：アデニンヌクレオチド関連化合物が UGT 活性に及ぼす影響について検討した。Wistar 系雄性ラット (6 週令) より定法に従い肝臓マイクロゾームを調製し、UGT 活性の測定に用いた。UGT の基質として、4-methylumbelliferone (4-MU) と estradiol を用い、それぞれのグルクロン酸抱合体 (4MUG、E3G および E17G) を HPLC にて定量した。また、脂肪酸アシル CoA による UGT 活性の調節についても検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) CYP-UGT 相互作用の普遍性：抗 CYP3A2 抗体により、CYP3A2 と複数の UGT が共免疫沈降した。UGT の共免疫沈降は、CYP2C11/13、CYP2B2、CYP1A2 に対する抗体を用いた場合にも観察された。これまで、CYP-UGT 同時発現による活性調節については検討していたが、厳密には、CYP-UGT の複合体に UGT 活性があるか否かは分かっていなかった。本研究では、抗 CYP 抗体で共免疫沈降された UGT、すなわち CYP-UGT 複合体が、触媒活性を示すことを初めて明らかにした。CYP-UGT 相互作用は、CYP および UGT 分子種によって異なることも示唆された。このように、CYP と UGT の相互作用がラットにおいても観察されることから、CYP による UGT 活性の調節が動物種を超えて見られる現象であることが示唆された。このことは、本研究の主題である、CYP 含量の個体差が UGT の遺伝的多型に依存しないモルヒネ抱合活性の個体差の要因であるとする作業仮説を支持するものである。本結果は、Drug Metab. Pharmacokinet. 誌に公表し、編集委員が選ぶ最優秀論文 (2007) の 2nd place に選ばれた。さらに、CYP3A4 がヒト UGT1A サブファミリー酵素の機能に及ぼす影響について

も検討した。この場合は、CYP3A4-UGT2B7 の時とは異なり、UGT の活性化が観察された。CYP-UGT 相互作用には多くの組み合わせがあり、組み合わせによって、その影響が異なる可能性が示唆された。

(2) CYP3A4-UGT2B7 相互作用に關与する CYP3A4 上の領域：GST-CYP3A4 (Tyr25-Ala503) および精製 CYP3A4 は EDC により UGT2B7 と架橋を形成した。しかし、GST-CYP3A4 (Met145-His267) は、UGT2B7 と架橋を形成しなかった。#1 抗体は Met145-His267 領域を認識しなかった。SPOT assay により、エピトープは Leu331 から Lys342 領域に存在することが明らかになり、CYP3A4 の J-helix 領域あるいは、その周辺領域が UGT2B7 との相互作用に關与する可能性が示唆された (Mol. Pharmacol., 2009)。UGT 側の相互作用部位についても、候補領域を、発現タグとの融合タンパク質として大腸菌に発現させ、基礎的な検討を継続して行っている。



**Fig. 1.** Proposed domain of CYP3A4 contributing to the interaction with UGT2B7 and the epitope selectivity of antibodies used in this study.

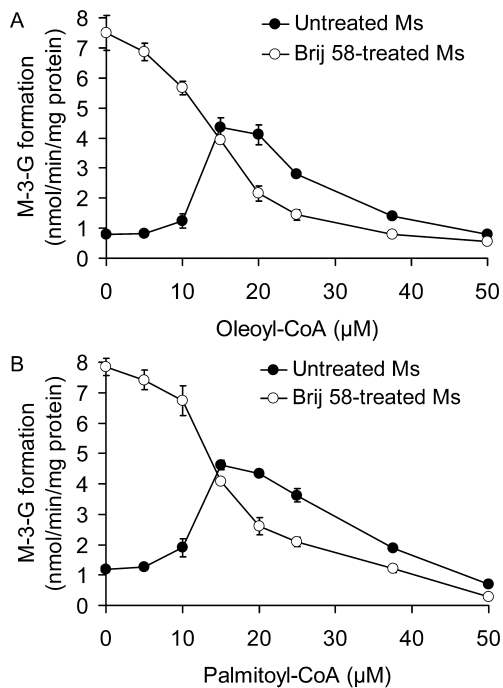
(3) ヒト肝臓マイクロゾームのモルヒネ抱合活性：転移性肝臓癌摘出時にセーフティマージンとして得られた正常肝組織を用いて、CYP3A4 含量の個体差が UGT2B7 の遺伝的多型に依存しないモルヒネ抱合活性の個体差の要因であるとする作業仮説の検証を試みた。この検討には、UGT2B7 レベルが同程度で、CYP3A4 レベルが異なる検体が必要となる。予備的に、数例を集めて検討したところ、一部仮説を支持する結果が得られているが、現時

点では、十分な例数がなく、更に例数を集める必要がある。

(4) 内因性低分子化合物による UGT 活性の調節：アデニンヌクレオチド類による UGT 活性の抑制 Adenine、adenosine、AMP、ADP、ATP、NAD<sup>+</sup>、NADH、NADP<sup>+</sup> および NADPH を用いて検討を行った結果、Adenine、ADP、ATP、NAD<sup>+</sup> および NADP<sup>+</sup> はいずれのグルクロン酸抱合体の生成も阻害した。さらに、速度論的解析を行った結果、これらの化合物の阻害形式は基質である 4-MU および estradiol、補酵素 UDPGA のいずれに対しても非競合的であることが分かった。一方、AMP は E17G 生成活性のみを抑制し、単独では E3G および 4MUG 生成活性に影響を与えなかった。しかし、AMP の共存は、adenine による 4-MU UGT 活性の阻害作用を弱めることから、AMP は adenine と共通の認識部位を介して UGT に作用し得ると考えられた。さらに、NADP<sup>+</sup> による UGT の阻害作用も、AMP の共存により弱められたことから、NADP<sup>+</sup> のによる阻害作用にも、少なくともアデニン骨格を介した作用が必要であることが示唆された。以上の結果から、内因性低分子化合物である ATP や NADP<sup>+</sup> は UGT の活性を阻害するが、それにはアデニン骨格が認識部位として重要であることが推測された (Biochim. Biophys. Acta, 2007)。ATP は、小胞体内腔に UGT 阻害作用を示す濃度域で存在することも見出した。グルココルチコイドにより、小胞体内腔の NADP 濃度が上昇する結果も得られており、NADP の小胞体内腔濃度は、栄養状態やストレスなど、様々な条件変化により変動することが予想される。また、これらアデニンヌクレオチドは、モルヒネ活性代謝物生成に關与するヒト UGT2B7 の活性も阻害することも分かった。アデニンヌクレオチドレベルの変動が、UGT2B7 の遺伝的多型に依存しないモルヒネ抱合の個体差の要因になる可能性がある。

(5) 内因性低分子化合物による UGT 活性の調節：脂肪酸アシル CoA による UGT 活性化 研究者らは、これまでに、脂肪酸アシル CoA が、UGT の内因性活性化因子であることを報告している。本研究では、アシル CoA レベルの変動が、モルヒネのグルクロン酸抱合活性にも影響することを、ラットを用いた基礎的検討から示唆した。ところが、ヒト肝臓マイクロゾームを用いた場合は、アシル CoA による活性化作用が観察される個体がある一方、多くの個体で活性化が認められない結果となった。UGT2B7 の遺伝子型では、この現象は説明できなかった。この不一致の原因を精査したところ、アシル CoA によるマイクロゾームの UGT 活性化には可塑性があることが明らかになり、ヒト肝臓凍結融解後のマイクロゾーム調製により、活性化作用が消失することが原因であると示唆された。これらのことから、アシル CoA は、動物種、UGT 分子種を超えた UGT の調節因子であり、UGT の遺伝的多型に依存せずに、モルヒネ活性代謝物の生成の個体差、個人内変動に關与する可能性が示唆

された (投稿中)。



**Fig. 2.** Acyl-CoA-dependent modulation of morphine UGT activity. The UGT activity with regard to morphine (M-3-G formation) was measured after pre-treating rat liver microsomes with different concentrations of acyl-CoA. In experiments A and B, microsomes were pre-treated with oleoyl-CoA (C18:1) or palmitoyl-CoA (C16:0) on ice for 30 min, in the presence and absence of detergent (Brij 58, 0.5 mg/mg of protein). Each plot represents the mean  $\pm$  S.E of triplicate assays.

#### 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3件)

- ① Ishii Y, Iwanaga M., Nishimura Y, Takeda S, Ikushiro, S., Nagata K, Yamazoe Y, Mackenzie PI, and Yamada, H., Protein-protein interactions between rat hepatic cytochromes P450 (P450s) and UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): Evidence for the functionally active UGT in P450-UGT complex. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2007 ; 22(5): 367-376.
- ② Nishimura Y, Maeda S, Ikushiro, S., Mackenzie PI, Ishii Y, and Yamada, H., Inhibitory effects of adenine nucleotides and related substances on UDP-glucuronosyltransferase: structure-effect relationships and evidence for an allosteric mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007;

1770(11):1557-1566. (corresponding author)

- ③ Takeda S, Ishii Y, Iwanaga M, Nurrochmad A, Ito Y, Mackenzie PI, Nagata K, Yamazoe Y, Oguri K, Yamada H. Interaction of Cytochrome P450 3A4 and UDP-Glucuronosyltransferase 2B7: Evidence for Protein-Protein Association and Possible Involvement of CYP3A4 J-Helix in the Interaction. *Mol Pharmacol.*, 2009; 75(4); 956-964. (corresponding author)

[学会発表] (計18件)

- ① 石井祐次, 竹田修三、アリフ スロクマド、Peter I Mackenzie、永田 清、山添 康、小栗一太、山田英之、シトクロム P450 3A4 (CYP3A4)と UDP-グルクロン酸転移酵素 2B7 の相互作用に関与する CYP3A4 の領域とその役割.第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会 (東京, 2007 年 6 月) *J. Toxicol. Sci.* S92 (2007)
- ② 石井祐次, Cytochrome P450 と UDP-Glucuronosyltransferase 2B7 の機能的相互作用について. P450 勉強会-UGT 研究会 (合同開催) (富山, 2007 年 7 月)
- ③ Arief Nurrochmad, Yuji Ishii, and Hideyuki Yamada, Activation of Morphine UDP-Glucuronosyltransferase by Fatty Acyl-CoAs. Abstracts of papers, 8<sup>th</sup> International ISSX meeting (Sendai, Japan, October 9-12, 2007), *Drug Metab. Rev.* 39, 261-262 (2007).
- ④ Yuji Ishii, Shuso Takeda, Arief Nurrochmad, Yūki Iwamoto, Yuji Ito, Peter I. Mackenzie, Kiyoshi Nagata, Yasushi Yamazoe, Kazuta Oguri, and Hideyuki Yamada, Interaction of Cytochrome P450 3A4 and UDP-Glucuronosyltransferase 2B7: Possible Involvement of a Region Located in the J-Helix of CYP3A4 in the Interaction. Abstracts of papers, 8<sup>th</sup> International ISSX meeting (Sendai, Japan, October 9-12, 2007), *Drug Metab. Rev.* 39, 301-302 (2007).
- ⑤ 西村嘉雄, 前田真吾, 上里祥代, 生城真一, Peter I. Mackenzie, 石井祐次, 山田英之, 肝小胞体内腔のアデニンヌクレオチドによる UDP-グルクロン酸転移酵素活性の調節の可能性. フォーラム 2007: 衛生薬学・環境トキシコロジー (大阪, 2007 年 11 月), *J. Health Sci.* 53, s-113 (2007).
- ⑥ 追崎俊也, 竹田修三, 西村嘉雄, 田浦太志, 森元 聡, 生城真一, Peter I. Mackenzie, 永田 清, 山添 康, 石井祐次, 山田英之, シトクロム P450 3A4 (CYP3A4)と UGT1A サブファミリーの相互作用について. フォーラム 2007: 衛生薬学・環境トキシコロ

- ジー (大阪, 2007 年 11 月), J. Health Sci. 53, s-224 (2007).
- ⑦ 西村嘉雄, 前田真吾, 上里祥代, 生城真一, Peter I. Mackenzie, 石井祐次, 山田英之, グルクロン酸抱合反応の内因性調節因子に関する研究: 肝小胞体内腔のアデニンヌクレオチドによる抑制とその機構. 第 24 日本薬学会九州支部大会 (福岡, 2007 年 12 月)
- ⑧ 追崎俊也, 竹田修三, 西村嘉雄, 田浦太志, 森元 聡, 生城真一, Peter I. Mackenzie, 永田 清, 山添 康, 石井祐次, 山田英之, シトクロム P450 3A4 と UGT1A サブファミリーとのタンパク質間相互作用. 第 24 日本薬学会九州支部大会 (福岡, 2007 年 12 月)
- ⑨ 石井祐次, 西村嘉雄, 前田真吾, 上里祥代, 山田英之, UDP-グルクロン酸転移酵素の活性調節因子としてのアデニンヌクレオチド: 小胞体内腔濃度とその変動. 日本薬学会第 128 年会 横浜, 2008 年 3 月)
- ⑩ 追崎俊也, 石井祐次, 竹田修三, 西村嘉雄, 田浦太志, 森元 聡, 生城真一, Peter I. Mackenzie, 永田 清, 山添 康, 山田英之, シトクロム P450 3A4 と UDP-グルクロン酸転移酵素 1A サブファミリーとの機能的相互作用. 日本薬学会第 128 年会 横浜, 2008 年 3 月)
- ⑪ Arief Nurrochmad, Yuji Ishii, Hitomi Nakanoh, Akinobu Taketomi, Yoshihiko Maehara and Hideyuki Yamada, Fatty Acyl-CoAs Activate Morphine UDP-Glucuronosyltransferases. 17<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (Saratoga, NY, July, 2008)
- ⑫ Yuji Ishii, Toshiya Oizaki, Shuso Takeda, Yoshio Nishimura, Shin'ichi Ikushiro, Futoshi Taura, Satoshi Morimoto, Akinobu Taketomi, Yoshihiko Maehara, Kiyoshi Nagata, Yasushi Yamazoe, Peter I. Mackenzie, Hideyuki Yamada, Cytochrome P450 3A4 enhances UDP-glucuronosyltransferase 1A-catalyzed glucuronidation of 3-hydroxybenzo[a]pyrene: One possible determinant of individual susceptibility to cancer risk from exposure to benzo[a]pyrene. 12<sup>th</sup> UDP-Glucuronosyltransferase and glucuronidation workshop (Quebec, Canada)(July, 2008)
- ⑬ 石井祐次, 内因性低分子化合物による UDP-グルクロン酸転移酵素活性の調節. 平成 20 年 P450 勉強会-UGT 研究会 (合同開催) (福岡, 2008 年 10 月)
- ⑭ Yuji Ishii, Yoshio Nishimura, Hideyuki Yamada, Decrease in the microsomal concentration of inhibitory adenine nucleotides is one possible mechanism of the 'Latency' of UDP-glucuronosyltransferase. 23<sup>rd</sup> Annual meeting of Japanese Society for the Study of Xenobiotics, Vol. 23 (2008) p.250
- ⑮ Arief Nurrochmad, Yuji Ishii, Hitomi Nakanoh, Akinobu Taketomi, Yoshihiko Maehara, Hideyuki Yamada, Activation of morphine UDP-glucuronosyltransferases by fatty acyl-CoAs in human and rat. 23<sup>rd</sup> Annual meeting of Japanese Society for the Study of Xenobiotics, Vol. 23 (2008) p.175.
- ⑯ 岩本有樹, 追崎俊也, Arief Nurrochmad, 竹田修三, 西村嘉雄, 生城真一, 田浦太志, 森元 聡, 永田 清, 山添 康, Peter I. Mackenzie, 石井祐次, 山田英之, シトクロム P450 3A4 と UDP-グルクロン酸転移酵素の機能的相互作用: UGT 分子種特異性. 第 25 日本薬学会九州支部大会 (延岡, 2008 年 12 月)
- ⑰ Arief Nurrochmad, 石井祐次, 中能ひとみ, 武富紹信, 前原喜彦, 山田英之, モルヒネ UDP-グルクロン酸転移酵素の脂肪酸アシル CoA による活性化: 活性化作用に肝臓の凍結融解が及ぼす影響. 日本薬学会第 129 年会 (京都, 2009 年 3 月)
- ⑱ 石井祐次, 岩本有樹, 追崎俊也, Arief Nurrochmad, 西村嘉雄, 生城真一, 田浦太志, 森元 聡, 永田 清, 山添 康, Peter I. Mackenzie, 山田英之, UDP-グルクロン酸転移酵素 1A1, 1A6 および 1A9 機能にシトクロム P450 3A4 同時発現が及ぼす影響. 日本薬学会第 129 年会 (京都, 2009 年 3 月) 28P-am068

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyushu-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 祐次 (ISHII YUJI)

九州大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号: 90253468

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし