

機関番号：12501

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390157

研究課題名 (和文) 医薬品による胎児への致命的・重篤な有害事象の発現機序の究明

研究課題名 (英文) Study on the mechanism of lethal and serious drug-induced adverse event in fetus

研究代表者

北田 光一 (KITADA MITSUKAZU)

千葉大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：90110345

研究成果の概要 (和文)：我が国で子宮頸管熟化不全治療薬として周産期の妊婦に投与される DHEA-S による致命的胎児毒性の原因究明を目的に胎児肝 DHEA-S 代謝酵素の多型 *CYP3A7\*2* の日本人での頻度を調べ、T409R 置換が DHEA-S 代謝能を低下させる可能性を明らかにした。胎盤 *STS* では日本人から 6 種類の新規多型を発見し、5'-上流域の多型については転写への影響を検討した。V476M 置換の DHEA-S 脱硫酸抱合活性への影響を検討した。胎児・胎盤での DHEA-S 代謝・輸送機能を損なう多型は、DHEA-S 体内動態に影響を及ぼすと考えられるが、母体への DHEA-S 投与と胎児毒性を直接結び付ける多型は見出せなかった。

研究成果の概要 (英文)：Dehydroepiandrosterone-3-sulfate (DHEA-S) plays important roles during pregnancy and is clinically used as an agent (prasterone sulfate) to treat pregnant woman with cervical ripening deficiency in Japan. However, several cases of fetal death have been reported after administration of prasterone sulfate to expectant mothers. We found that *CYP3A7.2* may have considerably reduced capacity for the metabolism of DHEA-S at a physiologically relevant concentration of this steroid *in vivo*. We discovered six novel SNPs of the *STS* gene. However, 5 SNPs present in postulated regulatory regions did not affect transcriptional activity, and V476M appeared to have little effect on both posttranscriptional expression of the enzyme and sulfatase activity toward DHEA-S. On the other hand, there was no non-synonymous SNP in all of exons, but one known SNP (-18T>C) was found in 5'-flanking region of the *SLC22A11* gene. The result of reporter gene assay revealed that the SNP did not appear to give considerable change in transcriptional activity of the *SLC22A11* gene. Although it was suggested that functional deficiency of these proteins due to genetic polymorphisms appear to affect pharmacokinetics of DHEA-S in fetal or fetal-placental unit, no polymorphism directly related to DHEA-S-induced fetal death was found in the *STS* and *SLC22A11* genes in this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：応用薬理学

キーワード：医薬品副作用・薬物相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、本研究の研究対象とした DHEA-S 製剤は3社から販売されており(現在は1社のみとなった)、海外における子宮頸管熟化不全の標準治療はプロスタグランジン製剤であった中で、日本国内のみで承認されていた。2000年にまとめられた調査報告によれば、当時年間20万人以上の妊婦(初産婦の1/3)に使用されていたものと推定されていたが、DHEA-S 製剤は、有意差はないものの、治験段階では胎児仮死を増加させる傾向が示されており、また本研究開始当初まで二桁を超える胎児仮死、突然死の自発的報告が製薬企業において収集されていた。それらを受け、2005年の薬食安発第1017001号によって、添付文書の重大な副作用の項における胎児死亡に関する記述が追加・改訂された。

一方、研究代表者は、ヒトでは実験動物と異なり、胎児の段階から肝臓に有意な薬物代謝酵素活性が検出され、その本体が、成人肝で主要な CYP3A4 とは異なる CYP3A7 であることを初めて見出し、その生理的役割が DHEA-S の解毒的代謝であること明らかにしていた(*J Biol Chem*, 262: 13534-7, 1987)。2005年に海外で、CYP3A7 における初めてのアミノ酸置換を伴う遺伝子多型が発見され、DHEA の代謝に及ぼすアミノ酸置換の影響が検討された。しかし、日本人における本多型(CYP3A7\*2)の存在および頻度は明らかでなく、また本酵素に特異的な基質であると考えられる DHEA-S の代謝に及ぼす影響は不明のままであった。

また、本研究では母体に投与された DHEA-S に胎児が曝露される場合、胎盤において Steroid sulfatase (STS) の代謝を受けることは必至と考えられたため、STS を標的としたが、胎盤における薬物代謝や薬物動態は研究が少なく、研究開始当初、日本人における STS の遺伝子多型については殆ど明らかになっていない状態であった。

さらに、DHEA-S 製剤の投与を必要とする妊婦は、子宮頸管熟化不全であり、熟化に必要な胎児が分泌する DHEA-S が母体に十分供給されない状況があると仮定し、胎児から胎盤に DHEA-S を輸送するトランスポーターの活性が低いという可能性を考えることとしたが、研究開始当初、胎児から胎盤に DHEA-S を輸送するトランスポーターは、主として OAT4 であろうという報告がなされたばかりであった。

## 2. 研究の目的

本研究では、本邦でのみ子宮頸管熟化不全に対する治療薬として承認されている DHEA-S 製剤の周産期妊婦への投与によって、稀に引き起こされる胎児仮死および突然死の原因を究明することを大目的として、

具体的には以下の目的に沿って研究を行った。母体への DHEA-S 製剤の投与が引き金となって、胎児の心停止が起こっていることが明白であることから、

- (1) 胎児肝に特徴的に高発現し、自らが大量に分泌している DHEA-S の濃度が毒性域に到達しないよう DHEA-S の解毒的代謝に関わっていると考えられる CYP3A7 の DHEA-S 代謝酵素活性に影響を及ぼす遺伝子多型が日本人に存在するか否かを検討する。
- (2) 胎盤に高発現し、胎盤に流入した DHEA-S の脱硫酸抱合反応を触媒する STS の発現量、あるいは代謝酵素活性に影響を及ぼす遺伝子多型を、日本人健常者から探索する。
- (3) 胎児から胎盤に DHEA-S を輸送する機能を主として担っていると考えられるトランスポーター OAT4 の発現量、あるいは輸送活性に影響を及ぼす遺伝子多型を、日本人健常者から探索する。

## 3. 研究の方法

- (1) CYP3A7 については、CYP3A7 の発現量を増加させることが知られている遺伝子多型、CYP3A7\*1C は東洋人では見出されない。そこでアミノ酸置換(T409R)を伴い、DHEA の代謝酵素活性を上昇させると報告されている CYP3A7\*2 の日本人における頻度を明らかにすると共に、CYP3A7.2 の異種細胞発現系を構築し、DHEA-S の代謝酵素活性への T409R の影響を明らかにした。
- (2) STS については、先天性酵素欠損は、X 連鎖性劣性遺伝魚鱗癬 (X-linked ichthyosis, XLI) となることが報告されている。しかし、DHEA-S 誘発胎児突然死の症例ならびにその両親が、XLI、あるいはその疑いがあるとの報告はない。そのため、本研究では日本人健常者より STS 多型探索を行った。多型探索は、X 染色体上の STS 遺伝子全 10 exons と、5'-flanking 領域約 3kb に対して、PCR-SSCP とダイレクトシーケンス法で行った。5'-Flanking 領域に見出された多型については、STS が高発現している細胞株(BeWo および MCF-7) においてポータージオアッセイを行い、それら多型が STS 遺伝子の転写活性に影響を及ぼすか否かを検討した。一方、本研究で新規に見出したアミノ酸置換を伴う多型については、異種細胞発現系を構築した。当初、大腸菌発現系を検討したが、結果に記すように、最終的に COS-1 細胞発現系に変更し、野生型 STS と多型 STS の DHEA-S 脱硫酸抱合活性を比較した。なお、活性の比較に先立ち、本研究で新たに逆相 HPLC

を用いた DHEA-S 脱硫酸抱合活性の測定方法を開発・確立した。

- (3) OAT4 については、第 11 番染色体上の *SLC22A11* 遺伝子全 10 exons と 5'-flanking 領域約 3kb につき、遺伝子多型を探索した。Exons に複数見出された多型は、いずれも synonymous 変異であったため、5'-flanking 領域に見出された多型について、STS 遺伝子同様、レポーター遺伝子アッセイを行った。

#### 4. 研究成果

- (1) 過去に報告されていた *CYP3A7\*2* の遺伝子多型診断法は誤診断を招くことが明らかとなったため、遺伝子診断法を改良し、日本人における多型の頻度を明らかにした。日本人(n=101)の *CYP3A7\*2* allele 頻度は 20%であり、*CYP3A5\*1* との連鎖不平衡関係も証明された。Sf9 細胞での *CYP3A7.2* 発現系を初めて構築し、アミノ酸置換 T409R の DHEA 代謝酵素活性へ及ぼす影響と比較したところ、*CYP3A7.2* の Kcat は、野生型の *CYP3A7.1* と比べて約 1.5 倍高く、過去に哺乳類細胞発現系で報告された結果と一致した。そこで、DHEA-S の 16 $\alpha$ -水酸化酵素活性に及ぼす T409R の影響を検討したところ、DHEA 同様 Vmax は *CYP3A7.2* において、*CYP3A7.1* よりも有意に高かった(図 1)。

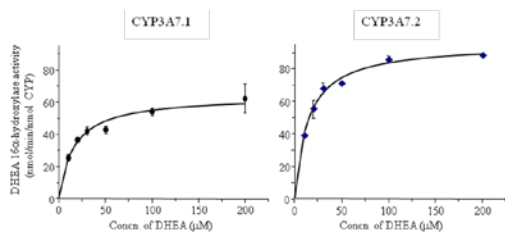


図 1 CYP3A7 T409RのDHEA代謝に及ぼす影響

しかし DHEA-S が基質となった場合は DHEA の代謝とは異なり T409R 置換によって kinetic profile が Michaelis-Menten 型から Sigmoid 型に変化した(図 2)。

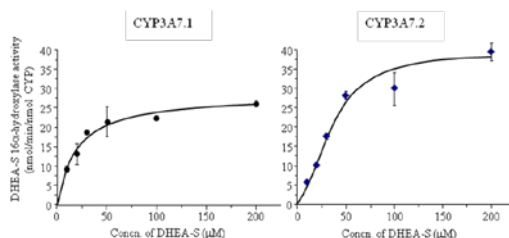


図 2 CYP3A7 T409RのDHEA-S代謝に及ぼす影響

胎児における DHEA-S の生理的血中濃度は 2.4~6.8  $\mu\text{M}$  と報告されている。一方、

DHEA-S 製剤を投与された妊婦での DHEA-S の最高血中濃度は 15  $\mu\text{M}$  とされていることから、仮に母体に投与された DHEA-S が、胎盤を介して胎児に流入したとしても、15  $\mu\text{M}$  を超えることはないと推定される。したがって、これら血中濃度では、*CYP3A7.2* の DHEA-S 代謝能は *CYP3A7.1* のそれよりもむしろ低くなることが明らかとなった。

- (2) 千葉大学医学研究院生命倫理審査委員会の承認(承認番号:千大医総第 5-24 号)を得た後に、遺伝子解析研究への協力に関して文書で同意が得られた日本人健康者(男性:45名、女性:48名、*STS* 遺伝子は X 染色体に存在するため計 141 alleles)の血液より抽出したゲム DNA を用いて *STS* の遺伝子多型を検索した。その結果、exon 1(non-coding)に c.155G>A, exon 10 に c.1647G>A を見出し、5'-flanking 領域に -2837G>A, -2427G>A, -1588T>C, -1117T>C, および -21G>A の 5 ヶ所の SNPs を見出した。-1588T>C を除き、7SNPs 中 5SNPs が新規の多型であった。特に exon 10 の c.1647G>A (図 3)は、アミノ酸置換(V476M)を伴っていた。見出した SNP それぞれに対して遺伝子多型診断法を開発し、日本人における頻度を明らかにした。各多型のアレル頻度は以下の通りであった。c.155G>A(0.071)、c.1647G>A(0.014)、-2837G>A(0.007)、-2427G>A(0.007)、-1588T>C(0.106)、-1117T>C(0.014)、-21G>A(0.007)。

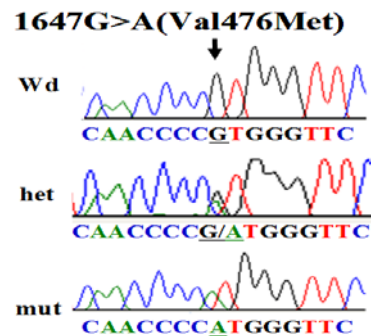


図 3 日本人 *STS* で見出したアミノ酸置換を伴う新規遺伝子多型

ヒト胎盤絨毛癌由来 BeWo 細胞を用いて、5'-flanking 領域の SNPs が転写活性に及ぼす影響を検討したところ、exon 1 non-coding 領域の c.155G>A は、転写活性を抑制する傾向が認められたが、統計学的な有意差は得られなかった。

一方、アミノ酸置換(V476M)の *STS* 発現量あるいは、*STS* 活性に及ぼす影響を検討するため、大腸菌発現系を構築した。図

4に示すように、ヒト STS 蛋白質を大腸菌に発現させることに初めて成功した。

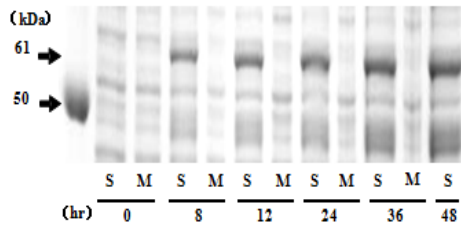
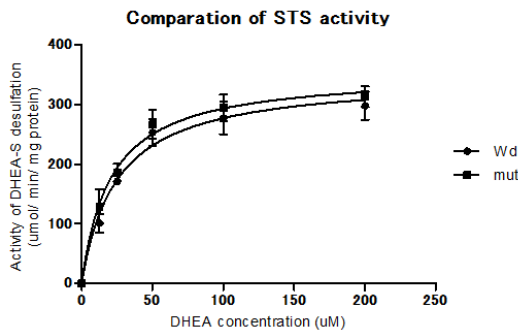


図4 大腸菌におけるヒトSTS蛋白質の発現

また STS では、DHEA-S の脱硫酸抱合反応を触媒するため、代謝物の DHEA を測定するが、従来、その測定法は、順相カラムを用いた HPLC 法が主流であった。本研究では、汎用性を考え、逆相カラムを用いた DHEA 測定法の開発を試み、簡便な診断法を確立することができた。確立した診断法を用いて、大腸菌で発現させたヒト STS の活性を測定したが、脱硫酸抱合活性を認めることができなかつた。原因は大



腸菌由来のプロテアーゼによる分解、あるいは糖鎖付加不全によると考えられたため、これまでにヒト STS の発現が報告されている COS-1 細胞を用いて発現させた。

Transfection 効率で補正したところ、発現 STS V476M の発現量は、野生型 STS と有意な差はなく、V476M の転写後翻訳への影響はないことが示された。また、DHEA-S 脱硫酸抱合活性を比較したところ、ミコゾーム蛋白質あたりの活性は有意な差がなかつた (図5)。

図5 STS による DHEA-S 代謝酵素活性に及ぼす V476M の影響

以上の解析より、V476M は STS 活性に著しい影響を及ぼす多型とは考えにくかつた。しかしながら、本研究では、野生型 STS および STS V476M を精製し、精製酵素蛋白質あたりの活性比較を行うことができなかつたため、厳密な活性比較は今

後の課題である。

(3) *SLC22A11* 遺伝子多型の探索により、exon 1 には c.686C>T (synonymous 変異、S104S)、exon 2 には c.857C>A (synonymous 変異、G161G)、5'-flanking 領域に -18C>T を見出したが、これら多型はいずれも新規なものではなく既知の多型であった。各多型に対して、遺伝子診断法を開発し、日本人での頻度解析を行ったところ、それぞれの多型のアレル頻度は、c.686C>T(0.01)、c.857C>A(0.02)、-18C>T(0.03)であった。しかしながら、本多型の探索では、NCBI に登録されている *SLC22A11* 遺伝子 5'-flanking 領域の -2446 - -2385 の 80 bp の間のみは、様々な検討を行ったにも関わらず、増幅させることが不可能であった。したがって、本領域には、数十 kb を上回る未知の塩基配列が存在している可能性があり、さらなる検討の余地が残された。

Exon 領域の多型は、アミノ酸置換を伴うものではなかつたため、5'-flanking 領域に見出された -18C>T が、胎盤における *SLC22A11* 遺伝子の転写活性に影響を及ぼすか否かについて BeWo 細胞を用いて検討した (図6)。

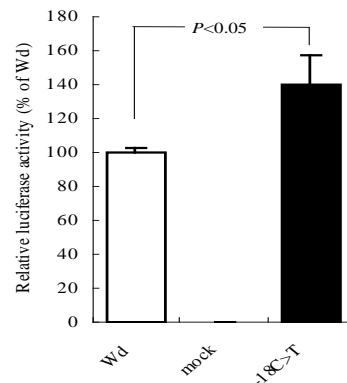


図6 *SLC22A11* 遺伝子に見出された多型の転写活性に及ぼす影響

以上の検討結果から、CYP3A7 に関しては、アミノ酸置換を伴う *CYP3A7\*2* が日本人にも存在し、欧米人に比べてその頻度は2倍以上高いこと、また DHEA-S に対しては、胎児が母体に投与された製剤由来の DHEA-S に曝露されたと想定した濃度域では本多型を有している胎児では、DHEA-S の解毒的代謝能が低い可能性を明らかにした。STS については、アミノ酸置換を伴う SNP を含め、日本人から 6 種類の新規な多型を見出したが、これらは STS の活性を顕著に低下させるものではなかつた。OAT4 については生理的により重要な蛋白質と考えられ、本研究では、活性に影響を及ぼす遺伝子多型を見出すこ

とができなかった。しかし約 2kb 上流に配列が特定できない推定プロモーター領域が存在し、この領域に発現制御の個体差と関連する重要な多型が存在する可能性も否定できないため、本領域の配列と OAT4 転写制御機構を明らかにする必要がある。本研究では、STS や OAT4 について母体に投与された DHEA-S が引き起こすと考えられる胎児毒性と直接関連すると考えられる多型を見出すことはできなかった。

#### 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 1 件)

- ① Matsumoto J, Ariyoshi N, Ishii I, Kitada M. *Drug Metab Pharmacokinet.* 査読有, 25(4): 2010, 403-407. Six Novel Single Nucleotide Polymorphisms of the Steroid Sulfatase Gene in a Japanese Population.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 松本 准、有吉 範高ら、妊婦への子宮頸管熟化薬投与における胎児突然死の原因究明に関する研究(第 2 報) 日本薬学会第 131 年会 2011.3.30 静岡
- ② 松本 准、有吉 範高ら、妊婦への子宮頸管熟化薬投与における胎児突然死の原因究明に関する研究 日本薬学会第 130 年会 2010.3.28 岡山
- ③ Ariyoshi N et al, The Prevalence in Carrier of CYP3A7\*2 Variant in Japanese, and Effects Substitution of CYP3A7 on the Metabolism of DHEA-S in vitro. The 23th JSSX Oct 30, 2008. Kumamoto

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

北田 光一 (KITADA MITSUKAZU)  
千葉大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：90110345

##### (2) 研究分担者

有吉 範高 (ARIYOSHI NORITAKA)  
千葉大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：00243957

##### (3) 連携研究者

石井 伊都子 (ISHII ITSUKO)  
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授