

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月16日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590164

研究課題名（和文） 医薬品適正使用のための基盤：薬物代謝酵素間の機能的相互作用の分子種特異性と個体差

研究課題名（英文） Basic studies on the appropriate usage of clinical medicine: isoform specificity of the functional interaction between drug metabolizing enzymes and the individual differences

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（和文）：

薬物代謝酵素シトクロム P450 (CYP)3A4 と UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) が生細胞内で相互作用をすることが示唆された。CYP3A4 は、UGT1A7 および UGT1A3 とも機能的相互作用し、その影響には分子種特異性があった。また、CYP3A4 の影響は UGT1A7 variant 間で異なることが示唆された。CYP3A4-UGT 相互作用がグルクロン酸抱合能の個体差の要因になり得るといふ仮説が支持された。さらに、内因性低分子化合物および食餌性因子などの環境因子によっても UGT 機能が変動する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Interaction between cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) and UDP-glucuronosyltransferase (UGT) isoforms in COS cells was evidenced by an analysis using Fluorescence Resonance Energy Transfer. Further, CYP3A4 affects the glucuronidation activity catalyzed by UGT1A7 and 1A3. However, the modifying effect of CYP3A4 differed between UGT isoforms. In addition, differences were also seen in the effect of CYP3A4 on UGT1A7 variants *1, *2 and *3. Therefore, these results support the hypothesis that the interaction between CYP3A4 and UGT is one of the determinants involved in the inter-individual difference in glucuronidation. On the other hand, it is also suggested that some of the endogenous and food-derived compounds modulate UGT activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、UDP-グルクロン酸転移酵素、グルクロン酸抱合、シトクロム P450、タンパク質間相互作用

1. 研究開始当初の背景

薬物代謝は、医薬品の薬効・毒性に密接に関連している。UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT)は薬物代謝の第二相反応を司り、第一相酵素のシトクロム P450 (CYP)等により酸化された薬物、あるいは薬物そのものをグルクロン酸抱合する。長きに亘り、CYPとUGTは別々に働くと考えられてきたが、研究代表者らは、これらが機能的相互作用をすることを発見した。すなわち、CYP3A4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見出した。このことは、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った。一方、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。研究代表者らは、脂肪酸アシル CoA およびアデニンヌクレオチド類が、それぞれUGT活性の促進的および抑制的な内因性調節因子であることを見出した。本研究開始時の研究背景は以下の三項目に要約できる。

- (1) CYP3A4は、ヒト肝臓における主要なCYPであり、その発現レベルに著しい個体差があることから、UGT機能の変動に重要な役割をもっていると考えられる。CYP3A4-UGT2B7の機能的相互作用が明らかになったが、他のUGT分子種もCYP3A4によって調節を受ける可能性がある。
- (2) CYP-UGT相互作用は、*in vitro*での確認にとどまっておらず、*in vivo*での相互作用は未だ証明されていない。
- (3) UGT活性は内因性低分子化合物、脂肪酸アシル CoA およびアデニンヌクレオチド類によって調節されることが分かったが、そのメカニズムの詳細は分かっていない。また、UGT活性の個体内変動に、食餌由来成分などの環境因子が影響が考えられるが、十分には検討されていない。

2. 研究の目的

医薬品適正使用の基盤形成に向け、薬物代謝酵素間の機能的相互作用の分子種特異性と

個体差を明らかにすることを目的とし、以下の三項目について明らかにすることを目的とした。

- (1) これまでの研究を進展させ、CYP3A4とUGT2B7の組み合わせにとどまらず、その他のUGT分子種、UGT1AサブファミリーとCYP3A4の機能的相互作用について解析し、CYP3A4-UGT1Aの相互作用におけるUGT分子種特異性について明らかにする。
- (2) CYP3A4-UGT相互作用が、生細胞内でも生起することをFRET(蛍光共鳴エネルギー移動)により明らかにする。
- (3) さらに、これまでに明らかにしたUGT活性調節に関する内因性低分子化合物、アシル CoA およびアデニンヌクレオチドの作用について更なる検討を行うとともに、UGT機能に影響を及ぼす食餌性因子などの環境因子を見出すことを目指した。

3. 研究の方法

- (1) UGT1Aサブファミリー分子種のBaculovirus-Sf9発現系をBac-to-Bac法を用いて構築した。それぞれの組換えbaculovirusを調製した。また、CYP3A4、UGT2B7の組換えbaculovirusは既に調製しているものを用いた。UGT単独発現とCYP3A4-UGT共発現を行い、マイクロゾーム分画を調製して、UGT活性を評価した。
- (2) pAcGFP vector および pmCherry vector にCYP3A4、UGT2B7 および UGT1A9 cDNA を組み込み、AcGFP、mCherryをC末端に融合タンパク質として発現させるベクターを構築した。これらを、COS-1細胞に発現させ、Nikon A1 共焦点顕微鏡にて、FRETが生起されるか否かを調べた。
- (3) 内因性低分子化合物でUGT活性を促進的に調節する脂肪酸アシル CoA が、UDP-グルクロン酸のマイクロゾームへの取り込みに及ぼす影響を検討した。また、アデニンヌクレオチドによるUGT阻害作用を、マイクロゾームを界面活性剤Brij-58処理とpore-forming peptide アラメチシン

処理した場合で検討した。更に、食餌性化合物による UGT 阻害作用について検討した。

4. 研究成果

- (1) CYP3A4 による UGT 機能変動 : UGT 分子種特異性 CYP3A4 が UGT2B7 機能に及ぼす影響について、バキュロウイルス発現系で検討を行ったところ、CYP3A4 同時発現により UGT2B7 の zidovudine 抱合活性が抑制されることが示唆された (第 3 回 国際薬物動態学会アジア地区会議 ISSX-AP 2009.5 にて発表)。

UGT1A7 については、wild-type *1 に加え、variant の*2 および*3 についても発現系を構築した。UGT1A7 の基礎的な性質を多型間で比較したところ、これまで 4-methylumbelliferone (4-MU) に活性を持たないとされていた*3 においても、*1 と遜色のない活性があることが分かり、*3 の触媒活性については事実誤認されている可能性が考えられた。一方、UGT1A7 に対する CYP3A4 の影響は、UGT1A7 の allelic variant 間で違いがあった。検討は、4-MU、4-hydroxybiphenyl およびイリノテカン活性代謝物 SN-38 について行ったが、変動のパターンは 3 つの基質で類似していた。そのため、ここでは 4-MU について述べる。*1 および*2 では、CYP3A4 の共発現により活性が上昇したが、*3 では低下した。また、*3 は、wild-type に比べて補酵素 UDP-グルクロン酸 (UDPGA) に対する親和性が有意に低いことが明らかになった。また、CYP3A4 は、UDPGA に対する親和性をさらに低下させた。従って、CYP3A4 と UGT の相互作用により、UGT による UDPGA の認識が影響を受けることが示唆された。(MDO & ISSX-EURO ジョイントミーティング, オランダ 2012.6 で発表予定)

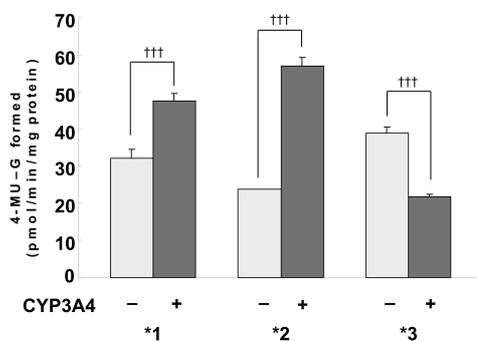


図 1. UGT1A7*1 (wild-type) と *2 および *3 (allelic variants) の 4-MU 抱合活性に及ぼす CYP3A4 共発現の影響 (***, p<0.001)

次に、CYP3A4 が UGT1A3 機能に及ぼす影響を検討した。酵素反応速度論的解析から、UGT1A3 単独発現に比べ CYP3A4 共発現では、UDPGA に対する Km が有意に低下する、すなわち、UDPGA に対する親和性が高くなることが示唆された (第 26 回日本薬物動態学会年会で発表)。CYP3A4 は、UGT の UDPGA に対する親和性に影響を及ぼすが、その影響は分子種間で異なることが示唆された。

- (2) CYP3A4 と UGT との生細胞内での相互作用 CYP3A4 と UGT が生細胞内で相互作用するかどうかを、FRET を用いて解析した。AcGFP をドナーに、mCherry をアクセプターにし

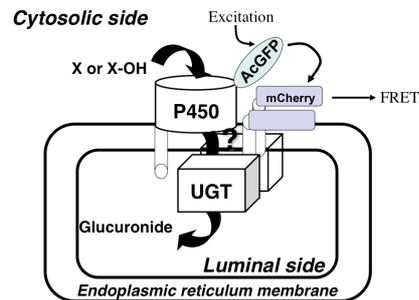


図 2. FRET による P450-UGT 間相互作用の検出

て FRET を行った。何も組み換えていない (null) ベクターを用いた場合には、CYP3A4 との間に FRET は認められなかった。一方、ホモオリゴマー形成をすることが分かっている UGT2B7 同士の組み合わせでは FRET が観察された。CYP3A4-UGT2B7 および CYP3A4-UGT1A9 の組み合わせでは、いずれにおいても FRET が観察された。このことから、CYP3A4 と UGT2B7 UGT1A9 が in vivo で相互作用している可能性が示唆された。(第 4 回国際薬物動態学会アジア地区会議 ISSX-AP、第 26 回日本薬物動態学会年會にて発表)

- (3) 内因性および食餌性低分子化合物による UGT 活性の調節

- ① 脂肪酸アシル CoA による UGT 活性の調節 UGT 機能への環境因子の影響として、生活習慣等で変動する可能性があるアシル CoA が、ヒト肝臓キメラマウス肝ミクロゾームのモルヒネ-6-グルクロニド生成活性 (UGT2B7 活性) を促進させることが明らかになった。また、そのメカニズムに UDP-グルクロン酸の小胞体への取り込み促進が推定された。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、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。本結果は、Drug Metab. Pharmacokinet.誌に公表し、編集委員が選ぶ最優秀論文(2010)の2nd placeに選ばれた。

- ② アデニンヌクレオチド類による UGT 活性の調節 アデニンヌクレオチド類のうち、ATP の阻害作用が最も強かったが、ADP の阻害作用は ATP に比べ弱く、AMP には阻害作用は認められなかった。また、NAD⁺ および NADP⁺ に阻害作用が認められたのに対し、各々の還元型には阻害作用は認められなかった。

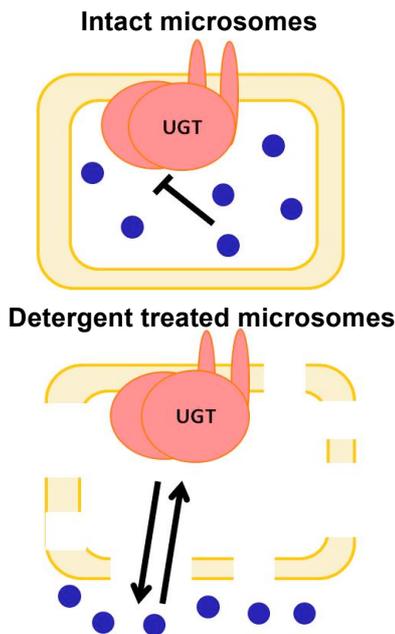


図 3. 'Latency' に関する新規仮説: 界面活性剤が阻害性のアデニンヌクレオチドを小胞体内腔より放出し、マイクロゾームの UGT を活性化する。

● : Inhibitory substances

UGT 活性に及ぼす影響を Brij-58 および alamethicin 存在下に比較検討したところ、alamethicin 存在下においては界面活性剤存在下に比べて UGT 阻害作用は弱くなり、その IC₅₀ 値は大きくなった。これらの処理によって小胞体から ATP が放出されたが、alamethicin 処理では界面活性剤処理マイクロゾームに比べ、より多くの ATP が小胞体内に残存していることが明らかになった。本研究の結果は、「阻害性ヌクレオチドの小胞体内腔からの放出」が UGT 活性の latency を説明する新たなメカニズムであるとする推定を支持するものと考えられる。(MDO & ISSX-EURO ジョイントミーティング、

オランダ 2012.6 で発表予定)

- ③ 内因性物質および食事成分による UGT 活性の調節 さらに調べる対象とする内因性物質の範囲を広げ、また食餌によっても、体内濃度が変動しうる環境因子についても、あわせて UGT 活性に及ぼす影響を検討した。その結果、野菜に高濃度で含まれるモノテルペノイドアルコール類により、ラットおよびヒトのモルヒネ UGT 活性が抑制されることを見出した。(日本薬学会第 132 年会にて発表)

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, Takeda S, Yamada H. Modulation of UDP-glucuronosyltransferase by Protein-Protein Association. Drug Metab. Rev. 2010, 42: 140-153. (Corresponding author)
- ②. Nurrochmad A, Ishii Y, Nakanoh H, Inoue T, Horie T, Sugihara K, Ohta S, Taketomi A, Maehara Y, Yamada H. Activation of Morphine Glucuronidation by Fatty Acyl-CoAs and Its Plasticity: A Comparative Study in Humans and Rodents Including Chimeric Mice Carrying Human Liver. Drug Metab. Pharmacokinet., 2010; 25: 262-273. (Corresponding author)
- ③. Ishii Y, Nurrochmad A, Yamada H. Modulation of UDP-glucuronosyltransferase Activity by Endogenous Compounds. Drug Metab. Pharmacokinet. 2010, 25: 134-148. (Corresponding author)

[学会発表] (計 19 件)

- ①. Yuji Ishii, UGT-CYP Protein Interactions: Role of Conjugating Enzymes in Modulating Oxidative Enzyme Activity. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics 2010 Annual Meeting at Experimental Biology (2010年4月28日, Anaheim, California, U.S.A.) (招待講演)
- ②. Yuji Ishii, Yuu Miyauchi, Hideyuki Yamada, Protein-Protein Interaction of Cytochrome P450 and UDP-Glucuronosyltransferase: Alteration of P450 activity by UGT. 4th Asian-Pacific ISSX meeting 2011 (2011年4月24日, Tainan,

- Taiwan) (招待講演)
- ③. 石井祐次, 山田英之, 麻薬の代謝とその変動要因. 日本法中毒学会第30年会 (長崎, 2011年6月10日) (招待講演)
- ④. Yuji Ishii, Protein-Protein Association of Cytochrome P450 and UDP-Glucuronosyltransferase: Its Relevance to Enzyme Function. 25th Annual meeting of Japanese Society for the Study of Xenobiotics, Vol. 25 (2010年10月8日, Ohmiya, Saitama) (シンポジストとして招聘)
- ⑤. Yuji Ishii, Arief Nurrochmad, Yoshio Nishimura, Kie An, Naoko Iida, Hideyuki Yamada, Alteration in UDP-Glucuronosyltransferase Function by Endogenous Substances with Low Molecular Weight. 26th Annual Meeting of Japanese Society for the Study of Xenobiotics, Vol. 26 (2011) (2011年11月18日, Hiroshima) (シンポジストとして招聘)
- ⑥. Yuji Ishii, Yuki Iwamoto, Toshiya Oizaki, Arief Nurrochmad, Yoshio Nishimura, Shin'ichi Ikushiro, Futoshi Taura, Satoshi Morimoto, Kiyoshi Nagata, Yasushi Yamazoe, Peter I. Mackenzie, Hideyuki Yamada. Cytochrome P450 3A4 Enhances UDP-Glucuronosyltransferase 1A9-Catalyzed Glucuronidation of SN-38, an Active Metabolite of Irinotecan. Abstract of papers, #150, The 3rd Asian-Pacific Regional ISSX Meeting, May 10-12, 2009, Bangkok, Thailand, Drug Metab. Rev., 41, s-2, p 69 (2009).
- ⑦. 石井祐次, Arief Nurrochmad, 山田英之, 脂肪酸および脂肪酸CoAがモルヒネグルクロン酸抱合活性に及ぼす影響. 日本法中毒学会第28年会 (2009年6月12日, 金沢)
- ⑧. Yuji Ishii, Alteration of UDP-Glucuronosyltransferase Activity by Cytochrome P450 3A4. Environmental Stimuli and Biological Responses (2009年6月26日, Fukuoka).
- ⑨. 石井祐次, 脂肪酸アシルCoAによるモルヒネグルクロン酸抱合の活性化. UGT研究会 2009 (2009年9月10日, 静岡)
- ⑩. Yuji Ishii, Arief Nurrochmad, Akinobu Taketomi, Yoshihiko Maehara and Hideyuki Yamada, Activation of Morphine Glucuronidation by Fatty Acyl-CoA: Enhanced Incorporation of UDP-Glucuronic Acid into the Endoplasmic Reticulum. 24th Annual Meeting of Japanese Society for the Study of Xenobiotics (2009年11月26日, Kyoto)
- ⑪. 古葉弘樹, 石井祐次, 追崎俊也, Arief Nurrochmad, 生城真一, Peter I. Mackenzie, 山田英之, ヒトUDP-Glucuronosyltransferase 1A7*3の触媒活性. 日本薬学会第130年会 (岡山, 2010年3月)
- ⑫. Hiroki Koba, Yuji Ishii, Toshiya Oizaki, Arief Nurrochmad, Shin-ichi Ikushiro, Yasushi Yamazoe, Kiyoshi Nagata, Peter I. Mackenzie and Hideyuki Yamada, Comparison of Catalytic Properties Between Human UDP-Glucuronosyltransferase 1A7*3, an Allelic Variant, and its Wild-type 1A7*1. 25th Annual Meeting of Japanese Society for the Study of Xenobiotics, Vol. 25 (2010) (2010年10月7日, Ohmiya, Saitama)
- ⑬. 古葉弘樹, 石井祐次, 追崎俊也, 竹田修三, 生城真一, 永田清, 山添康, Peter I. Mackenzie, 山田英之, UDP-グルクロン酸転移酵素1A7の遺伝的多型と触媒活性: シトクロムP450 3A4共発現による影響. 第27回日本薬学会九州支部大会 (長崎, 2010年12月11日)
- ⑭. 安貴愛, 西村嘉雄, 石井祐次, 山田英之, アデニン関連化合物によるUDP-グルクロン酸転移酵素活性の阻害作用: 界面活性剤およびpore-forming peptideアラメチン処理での比較. 日本薬学会第131年会 (静岡, 2011年3月)
- ⑮. Yuu Miyauchi, Yuji Ishii, Toshiya Oizaki, Yasushi Yamazoe, Kiyoshi Nagata, Peter I. Mackenzie, Hideyuki Yamada, Hetero-Oligomerization of UDP-Glucuronosyltransferases and Cytochrome P450 3A4: Analysis by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) and Modulation of CYP3A4 activity by UGTs. 26th Annual Meeting of Japanese

研究者番号：90253468

- Society for the Study of Xenobiotics, Vol. 26 (2011) (2011年11月16日, Hiroshima)
- ⑯. Kousuke Kinoshita, Yuji Ishii, Yuu Miyauchi, Toshiya Oizaki, Shin-ichi Ikushiro, Yasushi Yamazoe, Kiyoshi Nagata, Peter I. Mackenzie and Hideyuki Yamada, Effect of Cytochrome P450 3A4 on the Function of UDP-Glucuronosyltransferase 1A3: Alteration of Affinity toward UDP-Glucuronic Acid. 26th Annual Meeting of Japanese Society for the Study of Xenobiotics, Vol. 26 (2011) (2011年11月16日, Hiroshima)
- ⑰. Kie An, Yoshio Nishimura, Yuji Ishii and Hideyuki Yamada, Inhibitory Effect of Adenine-Related Compounds on UDP-Glucuronosyltransferase Activity in Human Liver Microsomes. 26th Annual Meeting of Japanese Society for the Study of Xenobiotics, Vol. 26 (2011) (2011年11月16日, Hiroshima)
- ⑱. 安 貴愛、石井 祐次、西村 嘉雄、山田 英之、生体内化合物によるUDP-グルクロン酸転移酵素活性の制御. 第28回日本薬学会九州支部大会(福岡、2011年12月10日)
- ⑲. 飯田直子、石井祐次、宮内 優、マッケンジー・ピーター、山田英之、モノテルペノイドアルコール類によるモルヒネ UDP-グルクロン酸転移酵素の阻害. 日本薬学会第132年会(札幌、2012年3月29日)

- (2)研究分担者
なし
- (3)連携研究者
なし

[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

<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