

## 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 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780125

研究課題名（和文）大豆イソフラボンを利用する薬物代謝酵素活性の評価

研究課題名（英文）Evaluation of the in vivo activity of phase II drug-metabolizing enzymes using soy isoflavone metabolism

## 研究代表者

細田 香織（HOSODA KAORI）

杏林大学・保健学部・助教

研究者番号：60433728

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒト血中における大豆イソフラボン代謝物の種類や量から、薬物代謝酵素（UGT および SULT）の活性を評価する方法を検討した。酵素反応実験により、UGT のうち、大豆イソフラボン代謝には UGT1A9 が主に関与すると判明した。一方、ヒト血中においては UGT および SULT により生成される 7-glucuronide-4'-sulfate が主要な代謝物であることを初めて明らかとした。大豆イソフラボン代謝に関与する酵素についてより詳細な検討を進めている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the activity of drug-metabolizing enzymes such as UGT and SULT using soy isoflavone metabolism in vivo. The results of enzymatic study indicated that UGT1A9 mainly catalyzed 7-glucuronidation of genistein. The quantification of 16 isoflavone metabolites in human plasma revealed that daidzein-7-glucuronide-4'-sulfate and genistein-7-glucuronide-4'-sulfate were major metabolites. Further study about drug-metabolizing enzymes catalyzing the glucuronidation and sulfation of isoflavones is being performed.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：大豆イソフラボン、薬物代謝酵素、UGT、SULT

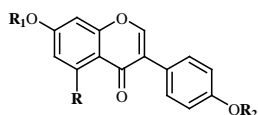
## 1. 研究開始当初の背景

臨床の現場において薬物治療における治療効果の個人差がしばしば問題になる。一般に薬物は、小腸から吸収され、組織に分布し治療効果を発揮した後、主に肝臓において代謝され、腎臓から尿へと排泄される。なかでも「代謝」活性の差異は、薬物の治療効果に

大きな影響を及ぼし、場合によっては甚大な副作用をもたらすこともある。この「代謝」の活性に深く関与しているのが薬物代謝酵素（シトクロム P-450、UGT、SULT など）である。すなわち、この薬物代謝酵素の活性の差異を評価したうえで治療を行うことがより良い薬物治療の提供に繋がる。薬物代謝酵

素の活性を、患者個々の遺伝子多型より評価する方法がある。例えば、塩酸イリノテカンによる抗がん剤治療において重篤な副作用（下痢や好中球減少症）の発現と UGT の一分子種「UGT1A1」の遺伝子多型の関連が指摘されており、治療前に遺伝子多型の判定が可能な体外診断用医薬品も保険適用になった。一方、酵素活性は食事や喫煙など生活習慣によっても影響を受けるために、遺伝子多型から推測される酵素活性と実際の酵素活性「表現型」が必ずしも一致しない場合が多く、簡便な「表現型」の評価法が求められている。

近年、大豆イソフラボンは、女性ホルモン様作用を持つことから乳癌や前立腺癌などのホルモン依存性の癌や、骨粗鬆症などの予防に有用であることが分かり、国内外より多くの注目を集めている。一方、<sup>(a)</sup>代表的な大豆イソフラボンであるダイゼイン、ゲニステインは主に UGT 及び SULT により代謝され、極性の高いグルクロン酸抱合体、あるいは硫酸抱合体となって循環し体外へと排泄されることも報告されている。これまでに、国内外において多くのイソフラボン動態研究が報告されている。しかしながら、多くは抱合体を酵素水解し、ダイゼイン、ゲニステインに変換して分析装置（HPLC、LC-MS/MS など）にて定量しており、抱合体そのものを直接定量分析した報告はない。抱合体は非常に極性が高いために血漿や尿などからの抽出が難しく、また抱合体の標品が市販されていないために入手困難であることがその一因である。新たなアプローチとして研究代表者は、<sup>(b)</sup>ヒト血漿中においてダイゼインとゲニステインのグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体を酵素水解することなく HPLC にてそのまま定量する簡便な方法を開発し、初めてヒト血漿において位置異性体を含めた各種抱合体の量を報告した。さらに、新たに血漿中において発見された代謝産物（4 種）も含めた抱合体標品（図 1）を合成し、新しい定量法も開発している。



R = H	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
daidzein (Dein)	H	H
D-7G-4'S	G	S
D-4',7-diG	G	G
D-7-G	G	H
D-4'-G	H	G
D-4',7-diS	S	S
D-7-S	S	H
D-4'-S	H	S

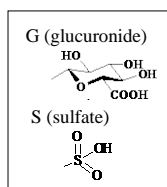


図 1. ダイゼイン及びグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体の構造。(R=OH の場合はゲニステイン、及びその抱合体)。  
□内は新たに発見した抱合体。

以上 2 点（下線 a, b）のことより、研究代表者はイソフラボン代謝産物の種類やその量から UGT 及び SULT の活性を評価できると考え、本研究の着想に至った。研究代表者の考えた評価法は、酵素により生成された代謝産物から酵素活性を評価するものなので、現段階では未確立である「表現型」の評価を可能にするものである。ヒトが日常的に摂取している大豆イソフラボンを評価ツールとし、最近では設置病院も多い HPLC を分析手段として用いるため、安全面やコスト面においても十分に臨床応用が可能であると考えられる。

## 2. 研究の目的

薬物治療効果の個人差は、薬物代謝酵素の活性の差異が主因である。そのため治療前に活性を評価することが望まれ、特に酵素の遺伝子多型に起因する活性の差のみならず生活習慣などの影響による差も考慮できる「表現型」での活性評価が望まれる。しかし、現段階では UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) および硫酸転移酵素 (SULT) の「表現型」での活性評価法は未確立である。代表的な大豆イソフラボンであるダイゼイン、ゲニステインは、主に肝臓で UGT 及び SULT により代謝され、大部分はグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体として体内を循環するため、これらの種類と生成量は双方の酵素活性を反映すると考えられる。このことから本研究では、大豆イソフラボン代謝を利用し、UGT 及び SULT の「表現型」での活性評価系を確立することを目的とした。大豆イソフラボンを摂取したヒト血中の抱合体の種類や量より評価するが、予め酵素実験により関与する UGT、SULT 分子種を同定し、各々の寄与率を解明することにより分子種をも考慮した活性評価法の確立が可能である。

## 3. 研究の方法

UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 及び硫酸転移酵素 (SULT) の活性評価系を確立するためには、各種イソフラボン代謝産物の生成に関与する UGT、SULT 分子種の同定と、比較対照群とするヒトのイソフラボン代謝産物の平均的な profile の解明及び主要分子種の寄与率の解明が必要である。研究代表者は本研究遂行の基盤となるイソフラボン代謝産物の簡便な定量法を既に開発しており、各種抱合体標品の準備も出来ている。各代謝過程に関与する UGT 及び SULT 分子種の同定を行い、酵素分子種を考慮した UGT 及び SULT の活性評価系を確立する。評価の比較対照群とするイソフラボン（きな粉 10 g）摂取後のボランティアの血漿における代謝産物の平均的な profile を解明し、in vitro 酵素反応実験により各代謝産物生成に関与するそれぞれの主要酵素分子種の寄与率を求める。次い

で大豆イソフラボンを摂取した個人の代謝産物の種類や量から、分子種を考慮した活性評価が可能な評価系を確立する。

(1) 各種イソフラボン代謝産物生成に関与する酵素分子種の同定—市販入手可能な酵素ミクロソーム溶液を用いて4通りのアプローチ (Kinetic study, Recombinant study, Inhibition study, Correlation study)を試みる。

(2) ヒト血漿中におけるイソフラボン代謝産物の平均的な profile の解明—イソフラボン (きな粉 10 g) を摂取したボランティアらの血漿中イソフラボン代謝産物を定量し、平均的な profile を解明する。

#### 4. 研究成果

(1) 各種イソフラボン代謝産物生成に関与する酵素分子種の同定

##### ① Kinetic study (ゲニステイン)

予めプールドヒト肝ミクロソーム (Pooled HLM) を用い、酵素反応条件の最適化を行った。生成される7位グルクロン酸抱合体 (G-7-G) および4'位グルクロン酸抱合体 (G-4'-G) への代謝速度を、基質であるゲニステインの濃度に対してプロットし、 $V_{max}$  値と  $K_m$  値を算出した (図3)。

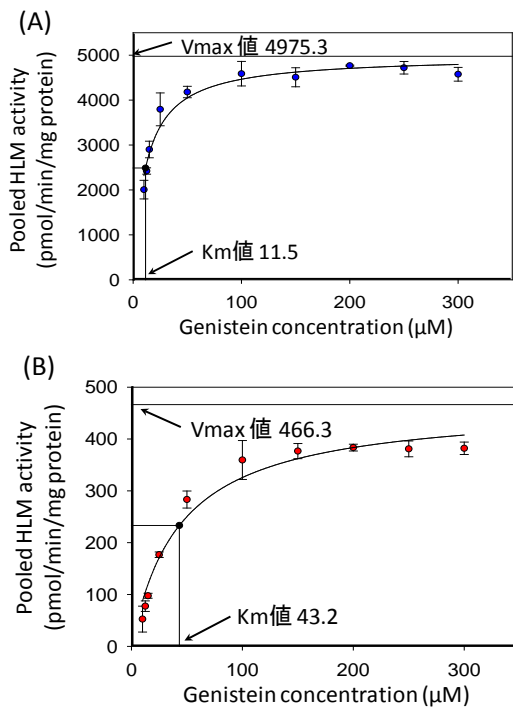


図3. (A) ゲニステインの7位グルクロン酸抱合体 (G-7-G) への代謝速度および (B) 4'位グルクロン酸抱合体 (G-4'-G) への代謝速度

##### ② Recombinant study

① の結果よりゲニステイン (10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M) をUGT 発現系ミクロソーム12種 (UGT 1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10,

2B4, 2B7, 2B15, 2B17) とそれぞれ反応させ、生成した G-7-G および G-4'-G を HPLC 法により定量分析し、UGT 分子種の代謝活性を評価した (図4)。

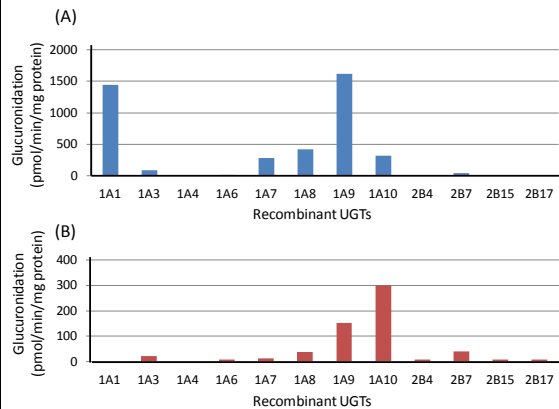


図4. (A) UGT 発現系ミクロソームによる7位グルクロン酸抱合体 (G-7-G) への代謝活性 (基質;ゲニステイン 10  $\mu$ M) および (B) 4'位グルクロン酸抱合体 (G-4'-G) への代謝活性 (基質;ゲニステイン 50  $\mu$ M)

UGT 分子種の代謝活性は、UGT 1A4を除く11種にて確認され、その活性はいずれも7位>4'位であった。G-7-G への代謝活性は UGT 1A9 と1A1、G-4'-G へは UGT 1A10 と1A9 が高いため、これらが主要分子種であると考えられた。また、UGT 1A10 は小腸のみに発現しているため、G-4'-G への代謝は小腸で主に行われ、肝臓での G-7-G と G-4'-G への代謝には UGT 1A9 が主に関与している可能性が示唆された。

(2) ヒト血漿中におけるイソフラボン代謝産物の平均的な profile の解明

大豆イソフラボン (ダイゼイン、ゲニステイン) を豊富に含むきな粉 10 g を摂取した被験者 10 名 (男女各 5 名) について、血漿中のイソフラボン代謝産物を HPLC により定量分析した。

##### ① ダイゼイン代謝産物の平均 profile

図5には、ダイゼインとその代謝産物の血中濃度推移を示した。血中ではグルクロン酸と硫酸の二重抱合体 D-7G-4'S が、測定対象とした8種の中で最も高い血中濃度を示した。なお、硫酸の二重抱合体 D-4', 7-diS は全被験者において検出されなかった。

各抱合代謝物について、血中濃度—時間曲線下面積 (AUC) の値より (図6)、血漿中において D-7G-4'S が 53.3% を占め、主要代謝産物であることを初めて明らかにした。

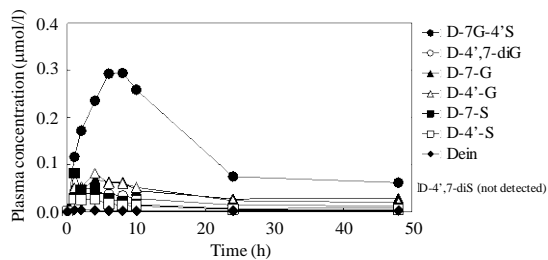


図5. 被験者10名におけるきな粉摂取後のダイゼイン代謝産物の血漿中濃度推移

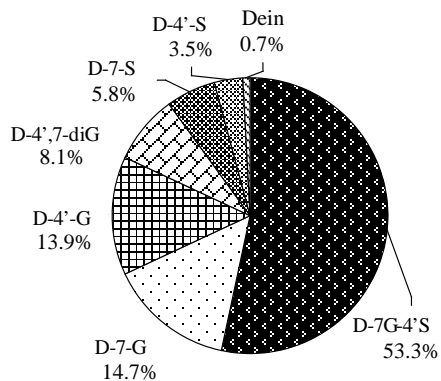


図6. 被験者10名におけるきな粉摂取後のダイゼイン代謝産物のAUCの割合

② ゲニステイン代謝産物の平均 profile

ゲニステインの血中主要代謝産物 (図7) は、グルクロン酸と硫酸の二重抱合体 G-7G-4'S とグルクロン酸の二重抱合体 G-4',7-diG の2種であった。各抱合代謝物についてAUCを比較すると (図8)、血漿中にお

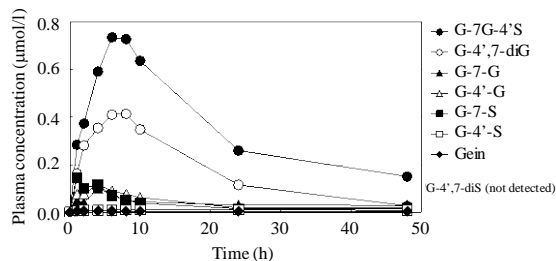


図7. 被験者10名におけるきな粉摂取後のゲニステイン代謝産物の血漿中濃度推移

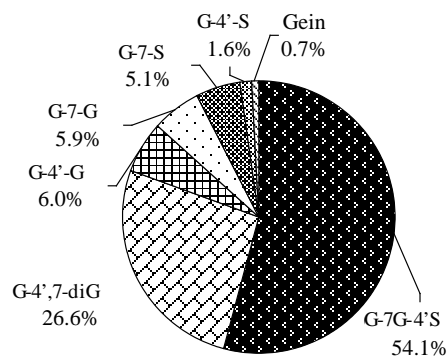


図8. 被験者10名におけるきな粉摂取後のゲニステイン代謝産物のAUCの割合

ける主要代謝産物は G-7G-4'S (54.1%) および G-4',7-diG (26.6%) であることが明らかとなった。

本研究では、ヒト血漿中においてイソフラボンの主要代謝産物がグルクロン酸および硫酸の二重抱合体 D-7G-4'S および G-7G-4'S、グルクロン酸の二重抱合体 G-4',7-diG であることを初めて明らかとした。このことから、これらの代謝経路に関与する酵素分子種の解明を中心に検討する必要がある。現在、代謝経路に関与する酵素分子種の全容を解明すべく、イソフラボン代謝産物である G-7-G および G-4'-G を基質とした酵素実験を進めている。

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 Kaori Hosoda, Takashi Furuta, Kazuo Ishii, Metabolism and disposition of isoflavone conjugated metabolites in humans after ingestion of kinako. Drug Metabolism and Disposition, 査読有, 39, 2011, P1762-1767  
DOI:10.1124/dmd.111.038281

[学会発表] (計2件)

- ① 西浦 彩、細田 香織、古田 隆、石井和夫、イソフラボンGenisteinの代謝物生成に関与するUGT酵素分子種の解明、日本薬学会第132年会、平成24年3月28日-31日、札幌
- ② 細田 香織、小林 志江、古田 隆、石井和夫、イソフラボンGenisteinの代謝に関与するUGT分子種の解明、日本農芸化学会2011年度大会、平成23年3月25-28日、京都

[図書] (計1件)

- ① Kazuo Ishii, Kaori Hosoda, Takashi Furuta, (Chapter 13), RSC Publishing, Isoflavones: Chemistry, Analysis, Function and Effects (Food and Nutritional Components in Focus), 2013, 683 (担当Chapter 13: P196-217)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細田 香織 (KAORI HOSODA)  
杏林大学・保健学部・助教  
研究者番号：60433728

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：

(4) 研究協力者

石井 和夫 (KAZUO ISHII)

杏林大学・保健学部・教授

研究者番号：80137968

加藤 誠久 (TOMOHISA KATO)

杏林大学・保健学部・准教授

研究者番号：80152726

古田 隆 (TAKASHI FURUTA)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70120152