

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390011

研究課題名(和文)薬物代謝の連鎖～CYP分子種の協同と競合による薬物代謝の網羅的解析～

研究課題名(英文)Chain Reaction of Drug Metabolism -A Comprehensive Study on the Cooperative and Competitive Drug Metabolism by CYP Isoforms

研究代表者

宇野 公之(Uno, Tadayuki)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00183020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：シトクロムP450(CYP)は薬物代謝の中心的役割を演じる重要な酵素であり、5種のヒト肝CYPによって市販薬物の90%以上が代謝される。本研究では、5種のCYPが薬物代謝の連鎖にどのようにかわるかを調べた。抗うつ薬アミトリプチリンは主としてCYP1A2、2C19、2D6で代謝されるが、構造が類似しているにもかかわらず、その代謝産物ノルトリプチリンに対する代謝活性は低下することが分かった。また、2C19とアミノ酸配列や立体構造がほぼ同一の2C9はアミトリプチリンをほとんど代謝しないが、その薬物特異性は72位アミノ酸の塩基性によって支配されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cytochrome P450s (CYPs) play a key role in human drug metabolism, and five CYP isoforms can metabolize more than 90% of clinical drugs in the market. In this study, we focused on a chain reaction of drug metabolism played by five isoforms. Although an anti-depressant amitriptyline is mainly metabolized by CYP1A2, 2C19, and 2D6, its metabolite nortriptyline, which is structurally similar to amitriptyline, was found to be poorly metabolized by these isoforms. On the other hand, CYP2C9 is a poor metabolizer of amitriptyline although it is homologous with 2C19 in amino acid sequence and three dimensional structure. We revealed that the drug specificity is regulated by the basicity of an amino acid residue at position 72.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：薬物代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) CYP の基質認識多様性 シトクロム P450 (CYP) はヒト薬物代謝の中心的役割を演じる重要な酵素であり、5種のヒト肝 CYP (1A2、2C9、2C19、2D6、3A4) によって市販薬物の90%以上が代謝される。現在我が国で市販されている薬物は約2,800種類あるが、このことはひとつの CYP が数百種類の薬物の代謝に関わることを示しており、薬物を含む各種外来性異物の代謝に対応すべく、ヒト肝 CYP が基質に対する特異性を犠牲にして多様性を選択した結果だと考えられる。実際、通常の酵素では、鍵と鍵穴の関係にたとえられるように、基質に対する酵素の特異性と結合親和性は高い(解離定数 K_d は μM オーダー)のに対し、当研究グループのこれまでの研究によれば、薬物に対する CYP の K_d は $100 \mu\text{M}$ オーダーのものが数多く、薬物親和性の低さが基質特異性の低さと関係するものと考えられる。

(2) 代謝の連鎖 肝臓の CYP が主として異物の代謝に関わるのに対し、副腎等に存在する CYP にはホルモン合成に関与するものが多く、基質特異性が高い。たとえば CYP11A はコレステロールを代謝してプレグネノロンを生成するが、これはさらに CYP17 によりテストステロンへ、次いで CYP19 によりエストラジオールへと変換される。このような「代謝の連鎖」はヒト肝 CYP でも報告されている。たとえば抗うつ薬アミトリプチリンは主として CYP 2C19 によって代謝されるが、その産物であるノルトリプチリンはさらに 2C19 と 2D6 によって代謝される。しかしながら、肝 CYP の基質特異性の低さに由来する酵素反応の複雑さにより、このような代謝の連鎖はほとんど解明されていないのが現状である。

2. 研究の目的

(1) 代謝産物の生成経路 たとえば、抗不安薬ジアゼパムは CYP2C19 により代謝され、N-メチル基がはずれたノルダゼパムとなる。この代謝産物はさらに CYP による代謝を受けてオキサゼパムとなり、最終的にグルクロン酸抱合を受けて排泄される。ヒト肝ミクロソームを使った研究により、ジアゼパムからオキサゼパムが生成することが示されているものの、複数の CYP が複雑に絡み合うため、どの CYP がその代謝を担うか特定できていない。このように、複数の CYP が含まれるミクロソームを使った研究では、「代謝の連鎖」を解明することは非常に困難である。

(2) 研究目的 そこで、本研究では代謝の連鎖が起こりうる薬物に注目し、それらの代謝に関わる CYP との結合親和性や代謝活性を調べることを目的とする。また、共鳴ラマン法等の分光学的手法により CYP の薬物認識機構を明らかにし、分子構造の言葉で薬物代謝を記述できるようにする。

3. 研究の方法

(1) 薬物結合親和性の測定 ヒト肝 CYP の多くは、活性中心のヘム鉄に水分子が配位した6配位低スピン状態を取る。基質薬物がヘムの近傍に結合すると、配位水がはずれてヘム鉄は5配位高スピン状態へと変化する。ヘム鉄の状態はヘムの吸収スペクトルに反映されるため、CYP を薬物で滴定した際の吸光度変化から薬物親和性を評価することができる。まず、20%グリセロールを含む 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) に CYP (終濃度約 $8 \mu\text{M}$) を加えて試料検体とした。同じ緩衝液に各種薬物を溶かしたストック溶液を用いて試料を滴定し、紫外可視分光光度計 (Shimadzu UV-2450、Beckman DU800) によりスペクトル変化を追跡した。吸収極大波長である 417 nm の吸光度変化を薬物濃度に対してプロットし、解析ソフト (KaleidaGraph) によるフィッティングから薬物解離定数 K_d を算出した。

(2) 薬物代謝活性の測定 5種の CYP (1A2、2C9、2C19、2D6、3A4) を各々調製し、酵素反応を行った。まず、NADPH 再生系 (NADPH、グルコース-6-リン酸、グルコース-6-リン酸脱水素酵素) の存在下、シトクロム b₅ と CYP 還元酵素の系で CYP を還元し、薬物と一定時間反応させた後、メタノールを添加して CYP を変性させることにより酵素反応を停止させた。CYP 還元酵素は NADPH から電子を受け取り、ヒト肝 CYP すべてに電子を渡すことができるため、同じ条件下ですべての CYP の代謝反応を測定することができる。反応を止めた溶液を現有の HPLC (Agilent 1100、Waters Acquity H-Class) に注入し、薬物量の減少を定量することにより反応速度を算出した。薬物初濃度に対して反応速度をプロットし、Michaelis-Menten 式を用いて解析することにより、酵素反応パラメータである V_{max} と K_m を得た。両者の比である V_{max}/K_m は内因性クリアランス (CL_{int}) とよばれ、代謝効率を表すパラメータとなっている。各 CYP ごとに CL_{int} を求めることにより、各薬物の代謝に対する各 CYP の貢献度を評価した。

(3) 共鳴ラマンスペクトルの測定 共鳴ラマン法は CYP の活性部位構造を探る上できわめて有力な手法である。本研究では、主として CO 結合型 CYP の共鳴ラマンスペクトルを測定した。励起光源として He-Cd レーザー (金門電気) の 442 nm の発振線を用い、ラマン散乱光を分光計 NR-1800 (日本分光) にて測定した。この励起波長で CO 結合型 CYP を測定すると、Fe-CO 伸縮振動に由来するピークが強く観測される。その波数は CO 近傍に結合した薬物の影響を受けるため、基質結合ポケット内での薬物の位置に関する情報を得ることができる。そこで、薬物フリー及び結合型 CYP の共鳴ラマンスペクトルを測定し、Fe-CO 伸縮振動の波数変化を調べた。

4. 研究成果

(1) 三環系抗うつ薬での代謝の連鎖 まず、代謝の連鎖が起こることが強く期待される薬物としてアミトリプチリンを用い、本薬物の代謝に関わると考えられている CYP1A2、2C19、2D6 との結合性について評価した。CO 結合型 CYP の共鳴ラマンスペクトルを測定したところ、2D6 では Fe-CO 伸縮振動に由来するピークが 476 cm^{-1} に検出され、アミトリプチリンの添加により 486 cm^{-1} へと大きくシフトした。これに対し、1A2 では 486 cm^{-1} から 488 cm^{-1} に、2C19 では 467 cm^{-1} から 469 cm^{-1} へと、小さな波数シフトしか示さなかった。このように、1A2 と 2C19 に比べ、2D6 では Fe-CO 伸縮振動がアミトリプチリンの結合によって大きく高波数シフトしたことから、基質結合ポケット内での薬物の配向性が大きく異なることが示唆された。これまでの研究により、2D6 はアミトリプチリンの7員環部分を水酸化するのに対し、1A2 と 2C19 は末端 N-メチル基を脱メチル化することが報告されている。このことから、共鳴ラマンスペクトルの結果は、各 CYP 分子種による代謝部位の違いを反映していると考えられた。

また、薬物代謝活性を測定した結果、1A2、2C19、2D6 とも、三級アミンをもつアミトリプチリン、イミプラミンと比較して、これらの代謝産物であり二級アミンをもつノルトリプチリン、デシプラミンに対する V_{\max} が低下していることが判明した。Cl_{int} で比較した場合、アミトリプチリン、イミプラミンは専ら 2C19 で代謝されることがわかったが、その代謝産物であるノルトリプチリンとデシプラミンに対する代謝活性は 6~8 倍程度低下することが明らかとなった。薬物結合性の評価も行った結果、代謝活性低下の原因は、二級アミンのへム鉄への配位や、代謝部位とへム鉄との距離に由来することがわかった。以上のように、中間代謝産物は構造的に類似している親化合物と同じ挙動を示すわけではないことが明らかとなった。

(2) 薬物間相互作用の影響 薬物代謝の連鎖を考える上で、代謝産物が薬物間相互作用により親化合物の代謝にも影響することが考えられる。CYP3A4 は市販薬物の約半数の代謝に関わる重要な酵素であるが、広い基質結合ポケットを持つため、複雑な薬物間相互作用を引き起こすことが知られている。そこで、CYP3A4 を中心に各種薬物との結合性について調べた。CYP3A4 の代表的な基質であるアセトアミノフェンやカフェインを用い、紫外可視吸収滴定法によってスペクトル変化を調べた結果、これら薬物は多段階の結合過程を示すことがわかった。一方、相対的に大きな基質であるジルチアゼムやエリスロマイシンを用いて調べたところ、これらでは1段階の結合過程しか認められなかった。このことは、CYP3A4 が大きな基質結合ポケットを有していることに起因すると考えられ、本酵素の

基質多様性の一因になっていると思われた。

さらに、基質結合にともなう活性中心への構造変化について紫外可視吸収スペクトルにより検討した結果、アセトアミノフェンでは 431 nm における吸光度の上昇と 409 nm における吸光度の低下が観測されたことから、2つの結合過程では、ともに強い軸配位子がへム鉄に配位しているものと考えられた。このような構造は、薬物の窒素原子が直接へム鉄に配位した結果によると考えられてきたが、窒素原子を含まないアセトアミノフェンの誘導体でも同様の変化が観測された。したがって、強い配位子は必ずしも窒素原子である必要はなく、薬物の結合にともない、おそらく水素結合を介して水分子がへム鉄に強く配位するようになったためであると考えられた。

(3) 薬物選択性を決めるアミノ酸残基 (1) で述べように、アミトリプチリンは主として CYP2C19 で代謝を受ける。2C19 は 2C9 とアミノ酸レベルで 92% の相同性を示すが、2C9 はアミトリプチリンの代謝をほとんど起こさない。その一方で、ジクロフェナクやフルビプロフェンのような酸性薬物は主として 2C9 で代謝を受ける。このような基質選択性を決定づけるメカニズムの解明は、代謝の連鎖に関わる CYP を明らかにする上できわめて重要と考えられる。そこで、2C9 と 2C19 を中心に各種薬物との結合性と代謝活性について調べた。代表的な基質であるジクロフェナクやフルビプロフェンを用いて検討した結果、これらの酸性薬物は CYP2C9 に高い親和性を持つことがわかった。一方、アミトリプチリンやランソプラゾールのような塩基性薬物は CYP2C19 に高い親和性を示した。

このような薬物選択性が現れる原因を探るため、両者の変異体を作製した。CYP2C9 は 72 位と 241 位に塩基性アミノ酸である Lys を持つのに対し、CYP2C19 は酸性アミノ酸である Glu を持つ。これらが薬物の選択性にかかわるか調べた結果、2C9 では Lys241 を Glu に置換すると酸性薬物の親和性が大きく低下したのに対し、2C19 では Glu72 を Lys に置換すると塩基性薬物の親和性が低下した。さらに、変異体を用いて薬物代謝活性を測定した結果、同様の傾向が認められた。このことから、2C9 と 2C19 はほぼ同じ立体構造を持つものの、薬物の認識に関わるアミノ酸残基が大きく異なることが明らかとなった。

(4) 総括 以上のように、分子生物学的手法で得られた変異体を用い、分光学的に得られる構造情報と、分析化学的に得られる代謝活性情報を組み合わせることにより、CYP による「代謝の連鎖」を分子レベルで詳細に解析する基本戦略が確立できた。代謝の連鎖により生じた中間代謝産物が薬の副作用の原因となりうることから、本研究の成果は、より安全な医薬品の開発やその適正使用に向けた有用な手法を与えるものと期待される。

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2件)

- ① Tamer Zekry Attia、Taku Yamashita、Mohamed Abdelkhalik Hammad、Akinori Hayasaki、Takumi Sato、Masayoshi Miyamoto、Yuki Yasuhara、Takashi Nakamura、Yusuke Kagawa、Hirofumi Tsujino、Mahmoud Ahmed Omar、Osama Hassan Abdelmageed、Sayed Mohamed Derayea、Tadayuki Uno、Effect of Cytochrome P450 2C19 and 2C9 Amino Acid Residues 72 and 241 on Metabolism of Tricyclic Antidepressant Drugs、Chem. Pharm. Bull.、査読有、62巻、2014、176-181
DOI:10.1248/cpb.c13-00800
- ② Tamer Zekry Attia、Taku Yamashita、Masayoshi Miyamoto、Atsushi Koizumi、Yuki Yasuhara、Jun-ichi Node、Yumi Erikawa、Yumi Komiyama、Chiaki Horii、Mayu Yamada、Mahmoud Ahmad Omar、Osama Hassan Abdelmageed、Sayed Mohamed Derayea、Tadayuki Uno、Comparison of Cytochrome P450 Mediated Metabolism of Three Central Nervous System Acting Drugs、Chem. Pharm. Bull.、査読有、60巻、2012、1544-1549
DOI:10.1248/cpb.c12-00719

[学会発表] (計10件)

- ① Tadayuki Uno、Molecular Analysis of Human Drug Metabolizing Enzyme, Cytochrome P450、The Eighth Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences (招待講演)、2013年12月5日、Ho Chi Minh City、Vietnam
- ② 倉橋 拓也、小泉 温史、山下 沢、宇野 公之、CYP3A4における薬物結合様式の分光学的解析、第23回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2013年6月21日、西東京
- ③ 花井 舜平、辻野 博文、山下 沢、宇野 公之、サイトグロビンの配位子結合性に対する両末端ドメインの影響、第23回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2013年6月21日、西東京
- ④ Tadayuki Uno、Jun-ichi Node、Sakiko Morita、Akihide Tsujimoto、Taku Yamashita、Hiroshi Aoyama、Effect of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) on the Activation of Procarcinogens in Human CYP1A2、Seventh International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines、2012年7月5日、Jeju、Korea
- ⑤ Tadayuki Uno、Yumi Erikawa、Masayoshi Miyamoto、Yuki Yasuhara、Taku Yamashita、

Hiroshi Aoyama、Effects of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) on Drug Metabolism in Human CYP2C9、Seventh International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines、2012年7月5日、Jeju、Korea

- ⑥ 宮本 正芳、飯賀 由実子、松本 麻希、安原 由樹、青山 浩、山下 沢、宇野 公之、Effects of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) on the Interaction of Human CYP reductase with CYP2C19 and Its Drug Metabolizing Properties、第22回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2012年5月31日、金沢
- ⑦ 宇野 公之、安原 由樹、宮本 正芳、山田 麻由、山下 沢、青山 浩、The role of lipid membrane in the course of drug metabolism by cytochrome P450、第22回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2012年5月31日、金沢
- ⑧ 宇野 公之、堀井 千明、山田 麻由、上村 真司、青山 浩、山下 沢、Effects of SNPs on the metabolism of Amitriptyline in CYP2D6、第22回金属の関与する生体関連反応シンポジウム、2012年5月31日、金沢
- ⑨ Tadayuki Uno、Mayu Yamada、Shinji Uemura、Sakiko Morita、Maki Matsumoto、Hiroshi Aoyama、Taku Yamashita、Three Cytochrome P450s Responsible for the Metabolism of Amitriptyline and Imipramine、15th International Conference on Biological Inorganic Chemistry、2011年8月8日、Vancouver、Canada
- ⑩ Tadayuki Uno、Masayoshi Miyamoto、Yumiko Iiga、Maki Matsumoto、Hiroshi Aoyama、Taku Yamashita、Effect of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) on the Drug Binding and Metabolizing Properties of Human CYP2C19、15th International Conference on Biological Inorganic Chemistry、2011年8月8日、Vancouver、Canada

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇野 公之 (UNO, Tadayuki)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：00183020

(2) 研究分担者

青山 浩 (AOYAMA, Hiroshi)
大阪大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：60291910

山下 沢 (YAMASHITA, Taku)
大阪大学・大学院薬学研究科・招聘准教授
研究者番号：70398246