

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590174

研究課題名(和文) アシルグルクロニドを加水分解する新規薬物代謝酵素の同定および毒性学的意義

研究課題名(英文) Toxicological significance of novel esterases involved in the hydrolysis of acyl-glucuronides

研究代表者

深見 達基 (Fukami, Tatsuki)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：00532300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：カルボン酸を有する薬は生体内でグルクロン酸抱合を受けることが多いが、この抱合体(アシルグルクロニド:AG)は肝障害をはじめとする様々な障害を引き起こすことが報告されている。本研究では、AGを加水分解する酵素として、 $\alpha$ / $\beta$ ヒドロラーゼドメインコンテイニング10 (ABHD10)を同定し、ミコフェノール酸、プロベネシドやジクロフェナクといった様々な薬物のAGを加水分解することを明らかにした。また、マウスを用いた検討より、ABHD10の機能が阻害されるとAGの血中濃度が上昇し、毒性発現の危険性が高まることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In general, drugs containing carboxylic acid are metabolized to acyl-glucuronide (AG) forms, which are considered to cause various toxicities including hepatotoxicity and anaphylaxis, in body. Therefore, it is conceivable that the enzymes hydrolyzing AG can attenuate the drug-induced toxicities. In this study, the enzyme responsible for AG hydrolysis was identified and its function was clarified. By the purification from human livers,  $\alpha$ / $\beta$  hydrolase domain containing 10 (ABHD10) was identified as an AG hydrolase. ABHD10 could hydrolyze various kinds of AG such as AGs of mycophenolic acid, probenecid, and diclofenac. For in vivo study, mice pre-treated with an ABHD10 inhibitor showed the significantly higher AG plasma concentration compared with non-treated mice after an oral administration of diclofenac. Thus, it was clarified in vivo that ABHD10 can affect the plasma concentration of AGs. ABHD10 may play important roles for attenuation of the AGs-induced toxicity.

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 加水分解酵素 アシルグルクロニド 薬物毒性

### 1. 研究開始当初の背景

カルボン酸を有する薬は生体内でグルクロン酸抱合を受けることが多い。一般的にグルクロン酸抱合反応は薬の水溶性を高めることにより生体外への排泄を促進させることから解毒反応として認識されている。しかし、カルボン酸を有する薬より生成するアシルグルクロニドは反応性が高く、細胞内のタンパク質と共有結合する性質があるため、肝障害を引き起こすことが報告されていた。また、他にも単球リンパ球から傷害性サイトカインである TNF $\alpha$  や IL-6 の放出も促進し、間接的にアナフィラキシーや Steven-Johnson syndrome を引き起こす事例も報告されていた。

薬物代謝に関与する加水分解酵素は、カルボキシエステラーゼを除いて、機能が未解明な部分が多く存在し、同じ薬物代謝酵素であるシトクロム P450 に比べて研究が遅れをとっている。アシルグルクロニドは構造内にエステル結合を有するため、ヒト組織にて加水分解酵素が脱抱合反応(加水分解反応)を触媒し、親薬物へ戻る可能性が考えられた。つまり、加水分解酵素がアシルグルクロニドの毒性に対して防御的に作用していることが考えられた。脱グルクロン酸反応は一般的に $\beta$ -グルクロニダーゼによって触媒されることが知られているが、 $\beta$ -グルクロニダーゼは代謝主要臓器である肝臓に高く発現していないこと、また免疫抑制薬であるミコフェノール酸のアシルグルクロニドは $\beta$ -グルクロニダーゼによって脱抱合されないが肝臓中で脱グルクロン酸反応を受けることが知られており、アシルグルクロニド脱抱合を触媒する新規酵素の存在が示唆された。

### 2. 研究の目的

代謝主要臓器である肝臓に着目し、アシルグルクロニドの加水分解反応を担う酵素を肝臓組織中より精製・同定した。精製の際は、 $\beta$ -グルクロニダーゼによって加水分解を受けないミコフェノール酸アシルグルクロニドの加水分解酵素活性を指標として単離した。また、同定された加水分解酵素がどのような薬のアシルグルクロニドを加水分解するか解析し、酵素学的特徴について解明を試みた。さらに、同定された酵素がアシルグルクロニド解毒機能を発揮するかどうか検討し、その酵素の毒性学的意義について検討した。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト肝臓よりミクローム、サイトゾル等の画分を抽出し、ミコフェノール酸アシルグルクロニド加水分解酵素活性を指標としてタンパク精製を行った。タンパク精製は、硫酸分画、イオンクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等のステップを経て行い、加水分解酵素活性は HPLC を用いて測定した。精製されたタンパク質のアミノ酸解析を行い、酵素の同定を行った。さらに同

定された酵素が本当にアシルグルクロニドを加水分解するかどうか、バキュロウイルス発現系を作成して酵素活性を確認した。

同定された加水分解酵素のアシルグルクロニド生成に与える影響を解析するため、同定された酵素に対する阻害剤を探索し、阻害剤の有無により、アシルグルクロニド生成活性に影響が認められるかどうか、in vitro において速度論的解析とともに評価した。

(2) 同定されたアシルグルクロニド加水分解酵素がミコフェノール酸のアシルグルクロニド以外に、どのような薬のアシルグルクロニドを基質とするのか、様々な薬物のアシルグルクロニドを基質として用いて触媒能を解析し、基質特異性を評価した。基質には肝障害やアナフィラキシーをはじめとする毒性が副作用として報告されている薬のアシルグルクロニドを選定した。

(3) 実際に生体内でアシルグルクロニド加水分解酵素がアシルグルクロニドによる毒性発現に対して解毒機能を発揮するのか、動物を用いて in vivo で評価した。使用する動物種として、マウスもしくはラットのどちらが適しているのか、それぞれの肝臓ホモジネートにおけるアシルグルクロニド加水分解酵素活性を測定することにより、評価した。選定された動物種のアシルグルクロニド加水分解酵素の発現系を作製し、ヒトと同様に加水分解触媒能を有することを確認した。アシルグルクロニド加水分解酵素の阻害剤を薬と併用投与することにより、肝障害の増強が認められるかどうか血中アラニントランスアミナーゼ(ALT)やアスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST)量を測定することにより評価した。また、その際の親薬物およびアシルグルクロニドの血中濃度変化も HPLC により測定した。

### 4. 研究成果

(1) ミコフェノール酸アシルグルクロニド脱グルクロン酸酵素活性が、ヒト肝臓のミクロソームおよびサイトゾルのどちらで認められるか解析した結果、両者において酵素活性が認められ、サイトゾルにおける酵素活性の方がやや高く認められた。よって、ヒト肝臓サイトゾル画分をタンパク精製に使用する酵素源とし、ミコフェノール酸アシルグルクロニド加水分解酵素を精製・単離した結果、 $\alpha/\beta$  hydrolase domain containing 10 (ABHD10) をアシルグルクロニド加水分解酵素として同定した。ABHD10 はこれまで機能が全く分かっておらず、本研究において初めて機能解明したことになる。ABHD10 発現系を作製し、ミコフェノール酸アシルグルクロニド加水分解酵素活性の速度論的解析を行った結果、ヒト肝臓ホモジネートを酵素源とした際に得られた  $K_m$  値と同程度の値が得られた。様々な加水分解酵素阻害剤を用いて ABHD10 発現系とヒト肝臓ホモジネート間で阻害強度を比較した際、類似した阻害傾向

が得られた。以上より、ヒト肝臓において ABHD10 がミコフェノール酸アシルグルクロニドの加水分解を担う主酵素であることを明らかにした。

ABHD10 を強く阻害した phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) を反応液に添加してヒト肝臓ホモジネートにおけるミコフェノール酸アシルグルクロニド生成酵素活性を測定した結果、1.7 倍の固有クリアランスの上昇が認められた。このように ABHD10 はアシルグルクロニド生成に対して抑制的に機能することを *in vitro* で明らかにした。

(2) 肝障害やアナフィラキシーといった毒性への関与が疑われている様々な薬のアシルグルクロニドを基質として用いて ABHD10 発現系による加水分解酵素活性を測定した結果、ミコフェノール酸の他にジクロフェナク、トルメチンおよびプロベネシドなどの薬物のアシルグルクロニドを加水分解した。一方、イブプロフェン、ケトプロフェンおよびナプロキセンなどの薬物のアシルグルクロニドの加水分解は触媒しなかった。非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)の中では酢酸系 NSAIDs のグルクロニドを基質とする傾向が認められた。

さらに、トルメチンとプロベネシドに関して、アシルグルクロニド生成酵素活性に ABHD10 が影響するか検討するために PMSF を反応液に添加して上記(1)と同様の解析を行った結果、1.5 から 1.7 倍の固有クリアランスの上昇が認められた。この上昇はケトプロフェン等を基質とした際には認められなかった。この差異は ABHD10 の基質特異性によるものと考えられる。

(3) *In vivo* において使用する動物種を選択するためにマウス(C57BL/6, male)とラット(SD, male)の肝臓ホモジネートを用いて様々な薬のアシルグルクロニド加水分解酵素活性を測定した結果、マウスにおいてラットの 10 倍高い活性が認められ、かつヒトと同等の活性を示したことから、マウスを用いて以降の検討を行った。プロベネシドおよびジクロフェナクの体内動態が ABHD10 阻害作用を示す tri-*O*-tolylphosphate(TOTP)の前投与により変動するか解析を行った結果、各々のアシルグルクロニドの血中濃度の上昇および親薬物の血中濃度の低下が認められた。アシルグルクロニド代謝物が ABHD10 の基質とならないイブプロフェンでは、TOTP 前投与により親薬物およびアシルグルクロニドの血中濃度に変動は認められなかった。よって、ABHD10 は *in vivo* においても特定の薬物のアシルグルクロニド生成に関与することを明らかにした。しかし、ABHD10 酵素活性を阻害しても肝障害の惹起は認められなかったため、ABHD10 とアシルグルクロニドによる毒性発現との関係性についてはさらに解析を進める必要がある。

以上より、一連の本検討により、新規加水

分解酵素 ABHD10 が薬物のアシルグルクロニドを加水分解することを明らかにし、アシルグルクロニドにより引き起こされる毒性に対して抑制的に働く可能性を示した。

## 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2件)

1. Iwamura, A., Fukami, T., Higuchi, R., Nakajima, M., and Yokoi, T. Human a/b hydrolase domain containing 10 (ABHD10) is a responsible enzyme for deglucuronidation of mycophenolic acid acyl-glucuronide in liver. *J. Biol. Chem.*, 287:9240-9249 (2012). (査読有)

2. Fukami, T. and Yokoi, T. The emerging role of human esterases. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 27:466-477 (2012). (査読有)

[学会発表](計4件)

1. 伊藤祐介、深見達基、中島美紀、横井 毅：ヒトにおけるプロベネシドアシルグルクロニド生成と分解を担う酵素の同定 日本薬学会北陸支部第 125 回例会 口頭 2013.11.17 金沢

2. Tatsuki Fukami and Miki Nakajima. Recent progress in characterization of esterases in human. 日本薬物動態学会第 28 回年会 2013.10.9-11 シンポジウム 東京

3. 伊藤祐介、深見達基、中島美紀、横井 毅：プロベネシドからのアシルグルクロニド生成とその逆反応を担うヒト薬物代謝酵素の同定 第 40 回日本毒性学会学術年会 2013.6.17-19 ポスター 千葉

4. 深見達基、伊藤祐介、岩村篤、中島美紀、横井毅 ヒト加水分解酵素がアシルグルクロニド生成に及ぼす影響 平成 25 年度 P450 と UGT/SULT 研究会 2013.6.1-2 ポスター 宮崎

[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]

なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

深見 達基 (Tatsuki Fukami)  
金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：00532300

(2)研究分担者  
該当なし

(3)連携研究者  
該当なし