

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：32624

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790200

研究課題名（和文） 成長に伴う薬物酸化酵素の個人間および個人内変動の解明

研究課題名（英文） Developmental variations in metabolic capacity of flavin-containing monooxygenase 3 in childhood.

研究代表者

清水 万紀子 (SHIMIZU MAKIKO)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90307075

研究成果の概要（和文）：フラビン含有モノオキシゲナーゼ 3 (FMO3)は、ヒト成人肝 FMO の主要分子種であるが、出生後に胎児型分子種から成人型分子種に置き換わることが報告されている。本研究では、小児ボランティアから得られた尿試料を用いた *in vivo* および個別小児肝ミクロゾームを用いた *in vitro* の結果から小児の成長に伴う FMO3 代謝効率の変動が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Human FMO1 and FMO3 are considered prominent functional forms expressed in fetal and adult livers, respectively. Developmental variations in functional metabolic capacity of flavin-containing monooxygenase 3 in childhood were shown both on the basis of *in vivo* phenotyping tests and in *in vitro* liver microsomal determinations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：フラビン含有モノオキシゲナーゼ、FMO3、小児、トリメチルアミン

1. 研究開始当初の背景

薬物酸化酵素フラビン含有モノオキシゲナーゼ 3 (FMO3) は臨床に用いられているオランザピン、ラニチジンなどの含窒素医薬品、シメチジン、スリンダクなどの含硫黄医薬品、ニコチン、食品由来トリメチルアミン等の幅広い化学物質の *N*-および *S*-酸化反応を触媒するヒト成人肝 FMO の主要分子種である。FMO3 は従来酵素誘導されにくいと考えられてきたが、ヒト肝のタンパク含量や酵素活性に約数十倍におよぶ大きな個人差が確認されている。本研究代表者は FMO3 酵素機能低下が原因となる疾患であるトリメチルアミン尿症に関する以下の研究を行ってきた。すなわち、日本人の自己申告トリメチルアミン尿症被験者 365 名の FMO3 遺

伝子のコーディング領域の解析を行い、日本人特有の新規遺伝子変異を 9 種見出し (Shimizu, Yakugaku Zasshi, 2009)、日本人 22 名の FMO3 遺伝子 5'-上流-3.4 kbp 領域に少なくともハプロタイプが 7 種存在することを進化論的解析から報告した (Allerston, Shimizu et al., Pharmacogenet. Genomics, 2007)。また、FMO3 遺伝子 5'-上流領域の変異が転写活性に影響を与えることおよび転写活性に関与する推定領域の一部を報告した (Shimizu et al., Drug Metab Pharmacokinet, 2008)。しかしながら、個人差に大きく寄与する配列は不明であり、その全体像は明らかになっていない。ヒト肝の胎児型分子種である FMO1 は出生後に成人型分子種である FMO3 に置き換わることが報

告されている(Koukouritaki et al., *Pediatr Res.* 2002)。これら *In vitro* の研究報告では小児肝の FMO3 発現量には著しい個人差が指摘されているが、その詳細は不明であり、*in vivo* における知見に関しては全く明らかではない。約 600 名の自己申告トリメチルアミン尿症日本人ボランティアから供与された尿試料中に排泄されるトリメチルアミンおよびその酸化体量の測定の結果、小児日本人ボランティアにおいて、成長に伴い FMO3 代謝効率の改善、すなわち成長に伴う表現型の変化が著しく認められる被験者を見出した。

本研究代表者は十数種の FMO3 遺伝子変異を見出し、これら C 末端付近のストップコドン変異およびアミノ酸置換変異を有する変異型 FMO3 のトリメチルアミンおよび薬物酸化酵素活性の低下を報告してきた。近年、欧米において、人工的に C 末端の 17 アミノ酸を欠損させた変異型 FMO3 を可溶性 FMO3 酵素源として推奨する報告がなされた (Catucci et al., *Biochemical Pharmacology*, 2012)。

2. 研究の目的

FMO3 はヒト成人肝 FMO の主要分子種であるが、胎児型分子種が出生後に成人型分子種である FMO3 に置き換わることが報告されている。*In vitro* の研究報告では小児肝の FMO3 発現量には著しい個人差が指摘されているが、その詳細は不明であり、*in vivo* における知見に関しては全く明らかではない。そこで本研究では、成長に伴った FMO3 表現型の個人差を明らかにすることを目的に、幼児あるいは小児期の FMO3 の酵素機能に着目した統合的な *in vivo* および *in vitro* 研究を実施した。さらに、FMO3 遺伝子変異の影響をさらに評価することを目的とし、日本人に見出された新規 FMO3 遺伝子変異を有する FMO3 ならびに C 末端欠損 FMO3 の酵素機能解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 自己申告によって、体臭の悩みをもつ日本人ボランティアの尿中に排泄されたトリメチルアミンをガスクロマトグラフィーを用いて分析し、主要酵素の代謝効率 (metabolic capacity) を評価した。特に小児試料に着目し、FMO3 代謝酵素活性の変動と幼児あるいは小児期の年齢との関連を検討した。さらに、小児期に尿中トリメチルアミン量を測定した被験者には経時的な尿試料の収集をお願いし、継続的に FMO3 表現型の解析を行った。

(2) 海外研究者の Dr. J. Steven Leeder (Childrens Mercy Hospitals and Clinics, Kansas) と共同で、米国の小児の尿中試料を

集め、*in vivo* でのトリメチルアミンの代謝効率をガスクロマトグラフィーを用いて分析し、日本人小児ボランティアのトリメチルアミン代謝効率と比較を行った。

(3) 小児ボランティアの頬粘膜細胞からゲノム DNA を抽出し、FMO3 遺伝子変異の 5'-上流領域、コーディング領域およびエクソン-イントロン接合部の塩基配列の解析を行うことにより、新規および既知遺伝子変異の探索を行った。

(4) 小児肝に発現する FMO3 タンパク発現量およびトリメチルアミン *N*-酸化酵素活性を複数の年齢の市販の小児肝マイクロゾームを用いて測定し、成人肝との比較を行った。同様に、小児肝に発現する FMO1 および FMO5 タンパク量および酵素活性の測定を行い、トリメチルアミン代謝への寄与を調べた。さらに、小児肝マイクロゾームを用いて各種医薬品酸化酵素活性を高速液体クロマトグラフを用いて測定し、成人肝で認められる酵素活性との比較を行った。

(5) 人工的に C 末端を欠損させた変異型 FMO3 酵素および酵素機能に及ぼす FMO3 遺伝子変異の影響は、大腸菌発現系を用いて調べた。

4. 研究成果

小児個別肝マイクロゾーム中の FMO3 含量は生後 13 日時点で得られた肝試料に比較して生後 2 年で得られた肝試料で高値を示した。これら肝マイクロゾームのトリメチルアミン *N*-酸化酵素活性は FMO3 含量の間に相関関係が認められた。約 50 名の小児ボランティアの尿試料より得た FMO3 代謝効率 (トリメチルアミン総量に対するトリメチルアミン *N*-酸化体の割合) を集団として解析した結果、被験者の年齢の上昇に伴い FMO3 代謝効率の増加が認められた。小児の成長に伴い、表現型として評価した FMO3 酵素活性は上昇することが推察された。酵素機能変動の要因をさらに明らかにするため、小児を含め FMO3 代謝効率が低いボランティアの FMO3 遺伝子型を調べた結果、6 種の新規 FMO3 遺伝子変異 (p.Ile441Thr, p.Ser195Leu, p.Val58Ile, p.Pro70Leu, p.Gly421Val, および p.Thr488Ala) を見出した。これらの変異を有するリコンビナント FMO3 酵素のトリメチルアミン *N*-酸化酵素活性は野生型に比較して低値であった。これらのことから、FMO3 の発現制御は、個人内および個人間で複雑に変動することが推察された。

さらに、人工的に C 末端を欠損させた変異型 p.Lys516Stop FMO3 酵素を用いて、酵素活性発現に C 末端が重要であることを明らかにした。これらの FMO3 表現型の個人差に関する知見は、FMO3 を介した小児医療での

薬物相互作用および医薬品適正使用あるいはトリメチルアミン尿症の対処法の構築の基盤的情報になると考えられる。

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 7 件)

(1) Shimizu, M., Kobayashi, Y., Hayashi, S., Aoki, Y., and Yamazaki, H. Variants in the flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) gene responsible for trimethylaminuria in a Japanese population. *Mol. Genet. Metab.*, 107, 334-340, 2012. 査読有
DOI: 10.1016/j.ymgme.2012.06.014.

(2) Shimizu, M., Kobayashi, Y., and Yamazaki, H. Note to readers. RE: "In vitro drug metabolism by C-terminally truncated human flavin-containing monooxygenase 3" by Catucci et al. (*Biochemical Pharmacology*, 83, 551-558, 2012). *Biochem. Pharmacol.*, 84, 411, 2012., 査読有
DOI: 10.1016/j.bcp.2012.05.001

(3) Shimizu, M., Denton, T., Kozono, M., Cashman, J. R., Leeder, J. S., and Yamazaki, H. Developmental variations in metabolic capacity of flavin-containing monooxygenase 3 in childhood. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 71, 585-591, 2011. 査読有
DOI: 10.1111/j.1365-2125.2010.03876.x

(4) Azuma, K., Lezhava, A., Shimizu, M., Kimura, Y., Ishizu, Y., Ishikawa, T., Kamataki, T., Hayashizaki, Y. and Yamazaki, H. Direct genotyping of cytochrome P450 2A6 whole gene deletion from human blood samples by the SmartAmp method. *Clin. Chim. Acta*, 412, 1249-1251, 2011. 査読有
DOI: 10.1016/j.cca.2011.03.017

(5) Niwa, T., Murayama, N., Umeyama, H., Shimizu, M., and Yamazaki, H. Human liver enzymes responsible for metabolic elimination of tyramine, a vasopressor agent from daily food. *Drug Metab. Lett.*, 5, 216-219, 2011. 査読有
DOI: BSP/DML/E-Pub/00074.

(6) Shimizu, M., Kiyotani, K., Kunitoh, H., Kamataki, T., and Yamazaki, H. Different effects of TERT, TP63, and CYP2A6

polymorphism on individual risk of tobacco-related lung cancer in male Japanese smokers. *J. Cancer Ther.*, 2, 690-696, 2011. 査読有
DOI: 10.4236/jct.2011.25093

(7) Kansaku, F, Kumai, T., Sasaki, K., Yukozuka, M., Shimizu, M., Tateda, T., Murayama, N., Kobayashi, S., and Yamazaki, H. Individual differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anesthetic agent propofol with regard to CYP2B6 and UGT1A9 genotype and patient Age. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 26, 532-537, 2011. 査読有
DOI: 10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-039

[学会発表] (計 10 件)

(1) 清水万紀子、佐藤歩、白石有紗、村山典恵、山崎浩史、ヒトフラビン含有酸素添加酵素 3 が関与する薬物相互作用、日本薬学会第 133 年会、2013 年 03 月 30 日、パシフィコ横浜 (横浜市)

(2) 山崎美穂、清水万紀子、宇野泰広、小林由布子、村山典恵、岩崎一秀、鶴藤雅裕、山崎浩史、フラビン含有モノオキシゲナーゼが触媒する薬物酸化酵素活性のヒトと実験動物の種差、日本薬学会第 133 年会、2013 年 03 月 30 日、パシフィコ横浜 (横浜市)

(3) 清水万紀子、小林由布子、山崎美穂、石井有紀、加瀬愛幸、山崎浩史、日本人集団において見出されたトリメチルアミン尿症に関わるフラビン含有酸素添加酵素の遺伝子多型、第 33 回日本臨床薬理学会年会、2012 年 11 月 29 日、沖縄コンベンションセンター (宜野湾市)

(4) 清水万紀子、佐藤歩、徳元久乃、沼尾恵里、村山典恵、山崎浩史、日本人集団におけるトリメチルアミン尿症の大規模調査、第 32 回日本臨床薬理学会年会、2011 年 12 月 2 日、アクトシティ浜松 (浜松市)

(5) 小林由布子、清水万紀子、林祥子、村山典恵、山崎浩史、日本人トリメチルアミン尿症に関わるフラビン含有モノオキシゲナーゼ 3 遺伝子変異の探索、第 32 回日本臨床薬理学会年会、2011 年 12 月 1 日、アクトシティ浜松 (浜松市)

(6) Makiko Shimizu, Marie Kozono, Yuko Kobayashi, Ayumi Sato, Norie Murayama, and Hiroshi Yamazaki, Intra- and inter-individual variations in metabolic capacity of flavin-containing

monooxygenase 3 in childhood. 日本薬物動態学会第26回年会、2011年11月17日、広島国際会議場（広島市）

(7) 佐藤 歩、清水万紀子、白石有紗、永島里美、村山典恵、山崎浩史、ヒトフラビン含有モノオキシゲナーゼ3が関与する薬物相互作用、第55回日本薬学会関東支部大会、2011年10月8日、東邦大学習志野キャンパス(船橋市)

(8) 池田恵理奈、清水万紀子、徳元久乃、村山典恵、山崎浩史、マルチプレックスPCR法を用いたフラビン含有モノオキシゲナーゼ3遺伝子多型判定法の確立、第55回日本薬学会関東支部大会、2011年10月8日、東邦大学習志野キャンパス(船橋市)

(9) 白石有紗、清水万紀子、永島里美、村山典恵、山崎浩史、野生型および変異型フラビン含有モノオキシゲナーゼ3を介した薬物相互作用、第38回日本トキシコロジー学会学術年会、2011年7月7日、パシフィコ横浜（横浜市）

(10) 林祥子、清水万紀子、村山典恵、山崎浩史、トリメチルアミン尿症の一因となるフラビン含有モノオキシゲナーゼ3遺伝子変異の酵素機能解析、第61回聖マリアンナ医科大学医学会、2011年7月22日、聖マリアンナ医科大学（川崎市）

〔図書〕（計1件）

山崎浩史、清水万紀子、中山書店、先天代謝異常ハンドブック（第2章 トリメチルアミン尿症（魚臭症候群））、2012、120-121

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 万紀子 (SHIMIZU MAKIKO)

昭和薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90307075