

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：14403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670077

研究課題名(和文)薬物の副作用低減のための非侵襲的薬物代謝酵素活性推定法の開発

研究課題名(英文)Development of noninvasive drug metabolizing enzyme activity estimate method for side effect reduction of the drugs

研究代表者

片桐 昌直(Katagiri, Masanao)

大阪教育大学・教育学部・教授

研究者番号：00185802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト・肝臓に発現している14種類の薬物代謝酵素であるCYPと8種類以上の副腎ステロイドを反応させた。その結果ほぼCYP3A4のみが、各種代謝物をHPLCチャート上に示した。その中で、17 α 水酸化プロゲステロンと11-デオキシコルチゾールからアンドロステンジオンの生成がGC-MSにより確認され、CYP3A4がLyase活性を有していることが明らかとなった。主要代謝物である6 β 水酸化物の同定も行い、6 β 水酸化活性とLyase活性における K_m 、 V_{max} の比較検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Fourteen CYPs which are drug metabolizing enzymes in human liver were reacted to more than eight kinds of adrenal steroids and their metabolites were identified. As a result, only CYP3A4 showed a various metabolite on HPLC chart. Production of androstendion from 17 α -hydroxyprogesterone and 11-deoxycortisol by CYP3A4 was confirmed by GC-MS. It was revealed that CYP3A4 can catalyze side chain cleavage reaction (Lyase activity) to the steroids. 6 β -Hydroxy metabolite which were main metabolite from 11-deoxycortisol was identified. Then, K_m and V_{max} of 6 β -hydroxylase activity and Lyase activity against 11-deoxycortisol were determined and compared.

研究分野：ステロイド代謝

キーワード：ステロイド代謝 薬物代謝 CYP3A4 リアーゼ活性

1. 研究開始当初の背景

薬物を体外に排泄するための薬物代謝は、主として肝臓においてシトクロム P450 (CYP) と呼ばれる酵素群が担っている。これら CYP の中には遺伝子多型による酵素活性の変動があることから副作用の低減のため、これらの遺伝子多型を調べ、各個人に合った薬物治療の方針を決めるオーダーメイド医療が進められようとしている。しかしながら同じ遺伝子型でも、その CYP で代謝される薬物の代謝能が個体によって約 100 倍もばらつくことが知られている。(例えば、CYP2D6 によるデキストロメトルファン代謝)。そのため各 CYP の個体での活性そのものを測定、あるいは推定する必要があると考えられている。一方これらの CYP は同時に、生体内で合成されるステロイドホルモンに対し各種の水酸化活性を有しており、その水酸化物は最終的に尿中に排泄される。研究協力者である本間は、選択的イオン法と組み合わせたガスクロマトグラフィー・質量分析 (GC/MS) により 63 種類の尿中ステロイドホルモン代謝物の一斉同定・定量を行い、各代謝物を合算することで、もとの合成量を推定し副腎等におけるステロイドホルモン合成酵素異常の診断に実績を挙げている。しかしながら、これら各種尿中代謝物がどのヒト肝臓 CYP によるものかなどの関係は、未だほとんど明らかにされていない。

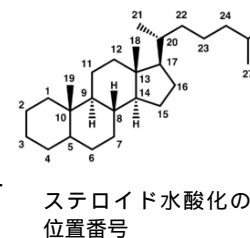
2. 研究の目的

そこでまず、既知尿中ステロイドホルモン代謝物と各肝臓 CYP によるステロイドホルモン水酸化物との対応関係を明らかにする。これらの対応関係だけでは活性予測ができない場合のために、各 CYP の新たなステロイドホルモン代謝物の探索・同定も行う。次に、これらのデータと尿中のステロイドデータにフィットするようにシミュレーション方法の検討を行い、尿中ステロイドホルモン代謝物データからの薬物代謝 CYP 活性の推定方法の確立を行う。

従来、薬学の研究領域である薬物代謝と内分泌医学の領域であるステロイドホルモン代謝とは別の領域であり、同じ CYP 酵素が関与しているにも関わらず、それぞれの成果を結びつける試みはなされてこなかった。論文としては、肝臓に存在する 2, 3 種類の CYP の 2, 3 種類のステロイドホルモンに対する代謝活性の報告はあるが、あくまでも酵素の一性質としての活性測定にすぎず、実際の代謝物との対応、特に水酸化部位の同定等については、詳しく検討されて来なかった。一方ステロイドホルモンの合成については、各合成酵素の精製や特徴づけなどは既に詳しく検討され、合成系についてはモデルを組み立てることが出来るほどの活性データが既に得られている。しかし血中ホルモン濃度は、合成と排泄(代謝)との平衡で決まるにも関わらず、特に

代謝に関わる CYP については系統だった研究はなされて来なかった。その理由としては、基本的に薬物代謝とステロイド代謝が全く異なった研究領域であるという点、さらに代謝物の同定の難しさがあげられる。つまり、水酸化の位置が多数あり、さらに同じ位置(番号)でも、位と位と立体異性体が存在し、分析が難しかった。しかしながら本申請の研究協力者である本間は、選択イオン検出法を用いた GC/MS (GC/MS-SIM) により、多数のステロイドホルモン代謝物(水酸化物)の一斉同定、定量に成功している (K, Homma *et al.*, 2003, *Endocrine Journal*, 50, 783)。さらにこの尿中のステロイドホルモン代謝物を一斉分析し得られるステロイドプロファイルを用いステロイドホルモン合成酵素の欠損症診断に成功しているが、上述の様に薬物代謝 CYP における水酸化酵素活性とステロイドホルモン代謝物の関係については、いまだ詳しい検討が行われていない。

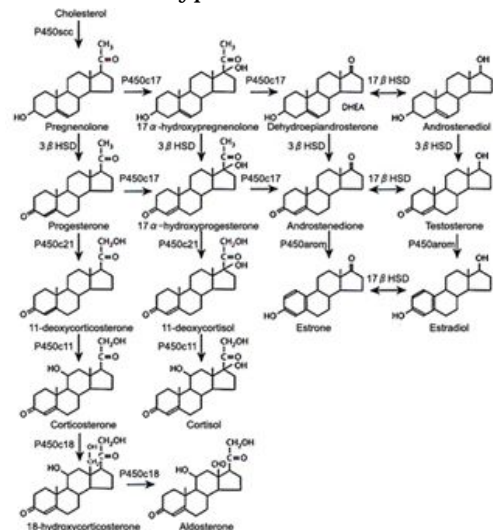
そこで本研究では、この尿中ステロイドのプロファイル(ステロイド代謝)と薬物代謝を結び付けるという新たな発想により、非襲撃的に肝臓における CYP 活性を推定する方法を開発し、薬物の副作用の軽減に役立てたい。



3. 研究の方法

材料

検討した CYP は、CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP4A1 であり、全て Cypex 社より購入した。



検討したステロイドは、Progesterone,

17 α -Hydroxyprogesterone (17OH-Prog), 11-Dexycorticosterone, 11-Deoxycortisol, Corticosterone, cortisol, Androstendion (AD)等の 4 ステロイドと Pregnenolone, DHEA 等の 5 ステロイドであり、いずれも副腎のステロイド代謝系の代謝中間体であり、SIGMA Inc.から購入した。

ステロイド代謝活性の測定

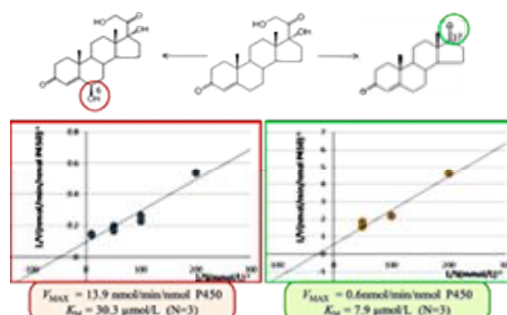
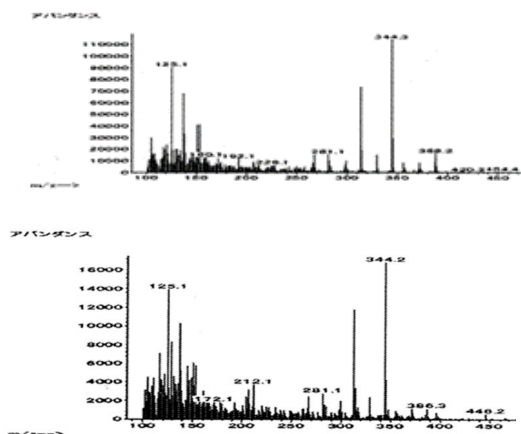
100 mM のリン酸緩衝液中に 50 pmol の肝臓・CYP を 1 種類加え、基質としてステロイドを終濃度 50 μ M となるように加えた。その後 1 mM の NADPH により反応を開始し、37 の恒温槽で 10 分間あるいは 5 分間反応させた。内部標準として酢酸ヒドロコルチゾンを用い、酢酸エチルを加えて直ちにポルテックスミキサーで攪拌することにより反応を停止させた。その後、3,000 回転で 10 分間遠心して有機層と水層を分離させ、代謝物を含む有機層のみを別の試験管に移し、窒素ガスを吹き付け、酢酸エチルのみを飛ばした。その後展開溶媒に溶かし、高速液体クロマトグラフィーにより分離・定量を行った。使用したカラムは C18-逆相カラムで、溶媒系は、水:メタノール:アセトトリル系を用い、ステロイドの検出は、240nm の吸収を用いた。また、5 ステロイドについては、GC-M S 分析を慶応大学病院中央臨床検査に依頼し行った。 K_m , V_{max} は、Lineweaver-Burk Plot により求めた。

4. 研究成果

4 ステロイドと CYP3A4

検討を行った 8 種類以上の基質と 14 種類の CYP の組み合わせで、HPLC のチャート上、有意な活性を示したのは、ほぼ CYP3A4 に限られていた。さらに CYP3A4 は、多数のステロイドに関し、種々の代謝物が検出された。その中でも、特に興味ある結果は、17OH-Prog に CYP3A4 を反応させさせたところ、代謝物として AD に対応するピークがチャート上得られことである。この 17OH-Prog からの AD の生成反応は、単なる水酸化活性ではなく、Lyase 活性と呼ばれる側鎖切断反応である。この種の反応は、これまで、副腎の CYP11A や CYP17 などの酵素では知られているが、肝臓の薬物代謝系酵素では報告されておらず、新たな発見となる。そこで、生成物の確認のため、反応物を GC-MS で分析したところ、下図の様に合成

品と同様なマススペクトルが得られた。上図のスペクトルは実際に反応を行ったサンプルであり、下のスペクトルは合成品のみを分析したものである。上と下のチャートに同じ位置でピークが現れたため、AD を生成していることが確認され、CYP3A4 は 17OH-Prog に対して Lyase 活性(17-20 側鎖切断反応)を示すことが分かった。また、17OH-Prog の 21 位に水酸基が入った 11-Deoxycortisol に対しても同様に Lyase 活性を示した。しかしながら 11-Deoxycortisol にさらに 11 位が水酸基となった cortisol に対しては Lyase 活性は、検出されなかった。一方、6 β 水酸化物と考えられるピークは、いずれの場合にも顕著に表れていた。6 β -Hydroxycortisol は市販で入手可能であったため、まず、cortisol に対する 6 β 水酸化活性の K_m , V_{max} を求めた。得られた V_{max} は 1.3 nmol/min/nmol P450, K_m は 10.7 μ mol/L であった。一方、6 β -Hydroxy-11-Deoxycortisol は市販されておらず、入手が出来なかった。そこで有機合成を行うこととし、出発材料として、11-Deoxycortisol を用い、2つの水酸基に保護基を導入後、酸化は能を行い、カラムにより荒く 6 α 体と 6 β 体を分離し、加水分解により保護基を外し、さらに HPLC により精製を行った。得られた精製標品を用い、HPLC 上で検量線を作成し、この検量線を用いて、CYP3A4 の 11-Deoxycortisol に対する 6 β 水酸化活性の K_m , V_{max} を求めた(表参照)。同じ 6 β 水酸化活性を、11-Deoxycortisol と Cortisol と比較してみると、 K_m は Cortisol の方が 3 倍低い、 V_{max} は 11-Deoxycortisol の方が、10 倍高かった。Cortisol に対する 6 β 水酸化活性は、以前より CYP3A4 の特異的活性として知られていたが、その K_m , V_{max} は詳しく調べられておらず、さらには、むしろ 11-Deoxycortisol に対する 6 β 水酸化活性の方が、 K_{cat} が高いことが明らかとなった。これは、6 β -Hydroxy-11-Deoxycortisol が市販されていないことも関係しているものと思われた。そこで、慶応大学病院臨床検査部内分泌部門と今後連携し、ヒト尿中代謝物として 6 β -Hydroxy-11-Deoxycortisol が検出されるかどうか、検討を行う予定である。さらに、17OH-Prog、11-Deoxycortisol、Cortisol に対する Lyase 活性の検討を行った。Cortisol に対する Lyase 活性は検出されなかったが、11-Deoxycortisol に対するリアーゼ活性では、 V_{max} は 0.62 nmol/min/nmol P450, K_m は 7.9 μ mol/L と求められた。得られた結

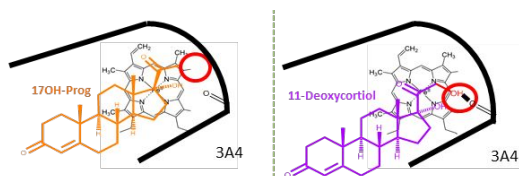


果をまとめたものでは、下表である。

Substrate (N=3)	6 β -Hydroxylase Activity		Lyase Activity	
	K _M (μ mol/L)	V _{MAX} (nmp/min/nmolP450)	K _M (μ mol/L)	V _{MAX} (nmp/min/nmolP450)
17 α -OH-Progesterone	-	-	96.7	6.65
			K _{cat} = 0.069	
11-Deoxycortisol	30.3	13.9	7.9	0.62
	K _{cat} = 0.46		K _{cat} = 0.069	
Cortisol	10.7	1.3	N.D.	N.D.
	K _{cat} = 0.12			

N.D.; not detected

この表より、Lyase 活性は、21 位の水酸基の導入により親和性は上昇するものの活性は低下し、さらに 11 位への水酸基の導入により、活性は 10 分の 1 程度に低下することがわかった。このことは、21 位の水酸基との相互作用が出来ることで親和性がまず一方、そのことで、ヘム鉄との位置関係に連れが生じ、活性が低下したのではないかと考えられた。(下図参照)

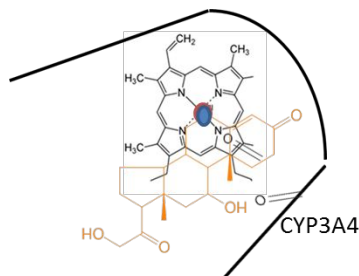


さらに 11 位に水酸基が入り Cortisol となると活性が見られなくなる。これは 11 位の水酸基の立体障害によるものと思われる。

なお、CYP3A4 では、17 位に水酸基のない、11-Dexycorticosterone, Corticosterone に対しては、17 位水酸化活性は、検出できなかったことから、17 位の水酸基も、これらの基質認識に重要な役割をはかしているものと考えられる。

一方、6 β 水酸化活性は、11 位の水酸基の導入でむしろ親和性が上昇しているが、これは、酵素に入る基質の向きが先ほどの Lyase 活性と逆を向く

ために、11 位の水酸基がむしろ相互作用を増やし親和性を高めたものと考えられる。



また、今回の測定では、もう一つの電子伝達経路である Cytochrome b₅ (b₅) を CYP の 5 倍量添加して活性を測定したが、b₅ のない場合には、11-Dexycortisol に対するリアーゼ活性は、K_m、V_{max} とともにほとんど変化がなかったが、16 β 水酸化活性では、V_{max} は 2/3 に低下する一方、K_m は、約 3 倍程度小さくなるのが分かった。これは、b₅ との相互作用によ

る構造変化が考えられた。

5 ステロイドと CYP3A4 と CYP3A7

5 ステロイドについては、CYP3A4 と CYP3A7 に着もくし、検討を行った。これは、CYP3A7 が、胎児および新生児肝における主要 CYP であり、出生後、CYP 3A4 に切り替わるものであり、胎児における薬物代謝、ステロイド代謝をほぼ担っていると考えられているからである。そこで、CYP3A4 と CYP3A7 と Pregnenolone, DHEA を反応させ、生成物を GC-MS により分析を行った。得られた代謝物は、16 位の水酸化物であり下表のような結果となった。

Substrate	Pregnenolone	DHEA	
		16 α OH-DHEA	16 β OH-DHEA
Product	16 α OH-Pregnenolone	16 α OH-DHEA	16 β OH-DHEA
CYP3A4	2.10	14.60	10.72
CYP3A7	3.72	47.47	3.40

得られた結果のうち、特に 16 -OHDHEA と 16 -OHDHEA の比率が、新生児および成人尿中代謝物の比率と逆になっていたことが注目すべき点であった。今回の測定は、基質濃度が一点であったため、今後この反応の K_m、V_{max} を求め、この点の検討を行う予定である。特に、新生児におけるステロイド、薬物代謝はまだまだ不明な点が多いため、今回の研究をより発展させたい。

まとめ

今回の研究では、当初の目的であった、代謝物からの CYP 活性の推定方法の確立については、明確な成果は得られなかったが、特に、肝臓において、これまで副腎でしか反応がなされないと考えられていた、ステロイドの側鎖切断反応 (Lyase 反応) が、肝臓の薬物代謝酵素である CYP3A4 によりなされることが明らかとなったことは、今後のステロイド代謝を考えるうえで、重要な知見となった。また、逆にステロイド代謝と薬物代謝の相互作用の可能性もあり、薬物代謝を考えるうえでも重要な発見である。特に、今回ステロイドとの反応が、ほとんど CYP3A4 のみであった点は、今後尿中ステロイド代謝物の意味を考えるうえでも重要であると考えている、なぜなら、CYP3A4 は、成人肝で、最も含量が多い CYP であると同時に、最も多くの薬物を代謝 CYP でもあるからである。

なお、今回の報告では、詳しく述べなかったが、CYP1A1 にも若干の代謝物のピークが見られたことから、代謝物の同定も含め検討を進めていく予定である。また、CYP3A4 は、種々のステロイドに対し、種々の代謝物を示しており、今後それぞれの代謝物の同定を進めることで、最も主要な CYP3A4 の特性を明らかにするとともに、CYP3A4 発現量の推定法の確立につなげていきたい。

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)

[学会発表](計 1件)

ヒト CYP3A4 の新たなステロイド代謝活性とその意義 片桐昌直, 今井健太, 渡辺綾乃, 本間桂子 第88回生化学会大会 平成27年12月4日

6. 研究組織

(1)研究代表者

片桐 昌直 (Katagiri, Masanao)

大阪教育大学・教育学部・教授

研究者番号：00185802