

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293029

研究課題名(和文)3次元培養を用いた化学物質による薬物代謝酵素の分解に伴う毒性変動評価

研究課題名(英文) Assessment of toxicity associated with protein degradation of drug-metabolizing enzymes by chemicals in three-dimensional culture

研究代表者

太田 茂(Ohta, Shigeru)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(薬)・教授

研究者番号：60160503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：化学物質による薬物代謝酵素タンパク質の分解過程の制御に伴うその酵素活性変化、毒性への寄与に関する研究はほとんどない。肝細胞の3次元培養系において、アセトアミノフェンは、薬物代謝酵素のひとつCYP3Aタンパク質の分解過程を阻害することにより蓄積させ、酵素活性を上昇させることが明らかとなった。アセトアミノフェンは、CYP3Aにより肝毒性を惹起する反応性代謝物を生成することが知られているが、これは、本知見にも関与している可能性がある。アセトアミノフェン類縁体も同様の現象を示すものがあり、詳細なメカニズム解明につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：There are few reports regarding toxicity and enzyme activity associated with drug-metabolizing enzyme accumulated by disruption of its protein degradation system. We have clarified that acetaminophen led to inhibit CYP3A protein degradation and accordingly induced its enzyme activity using 3-dimensional hepatocyte culture. The results could contribute formation of the reactive metabolite by CYP3A, which is known to induce hepatotoxicity. Acetaminophen analog also showed inhibitory effects on CYP3A degradation in 3-dimensional culture. These findings could lead to clarify the detailed mechanism.

研究分野：衛生薬学

キーワード：薬物代謝酵素 ユビキチンプロテアソーム アセトアミノフェン 3次元培養

1. 研究開始当初の背景

生体内のタンパク質の主な分解経路には、ユビキチンと呼ばれる分解シグナルタンパク質が連続的な酵素反応により標的タンパク質に付加された後、プロテアソームと呼ばれる酵素複合体に運ばれ、選択的に分解される「ユビキチンプロテアソーム系」と、細胞質成分をリソソームで分解するための機構「オートファジー系」があることが知られている。これは、重要な細胞浄化システムの一環である。

一方、低分子化合物は、薬物(異物)代謝酵素によって代謝され体外に排泄させる解毒機構をもつ。薬物代謝酵素は、内在性物質や化学物質による転写活性化による発現制御がよく知られている。転写活性化による薬物代謝酵素の酵素誘導は、異物代謝による解毒を促進させるが、生成する代謝物が毒性を誘発する場合もある。例えば、環境化学物質のひとつである芳香族炭化水素は、薬物代謝酵素チトクローム P450 (CYP)の発現を誘導させ、異物代謝活性を促進させる。しかし一方で生成した活性代謝物によって毒性が増強される。このことから、薬物代謝酵素の発現変動の変動評価は、化学物質の解毒、毒性化を理解する上で重要である。

薬物代謝酵素のうち、最も寄与が高いものはチトクローム P450 (CYP)であるが、CYP2B6 や CYP3A4 はユビキチンプロテアソーム系により、CYP2C9 や CYP2E1 はユビキチンプロテアソーム系とオートファジー系の両方で分解されることが報告されている (Kim et al., 2016)。しかしながら、化学物質によるこれら分解システムに与える影響、それに伴う毒性発現に関する研究はほとんどない。本研究では、化学物質の薬物代謝酵素タンパク質の分解系への制御とその毒性への寄与を調べることを目的としている。

2. 研究の目的

評価にあたり、本研究では3次元培養系に着目した。3次元培養系は、単層培養よりも *in vivo* に近い状態を維持することが期待されている。3次元培養プレートを用いて肝細胞の細胞塊(スフェロイド)を構築し、薬物代謝酵素発現量を調べたところ、CYP やグルクロン酸転移酵素 (UGT) や硫酸転移酵素 (SULT) の発現は、スフェロイドが形成する前は減少するものの、形成されると一定に維持されることが分かった (sanoh et al., 2014)。スフェロイドを形成させることで、*in vivo* 同様の薬物代謝酵素の発現と分解の高次調節機能がとれるようになるものと考えられる。化学物質による薬物代謝酵素タンパクへの分解影響を評価するには、薬物代謝酵素の mRNA やタンパク質発現が一定に維持されている条件で実験を行うことが好ましく、3次元培養系はその評価系として有用と考えた。

解熱鎮痛剤アセトアミノフェン (APAP) は、マウスにおいて CYP3A11 mRNA 発現量を増加させるが、転写活性化に関連する核内受容体 CAR を介して CYP3A を酵素誘導する可能性が示唆されている (Zhang et al., 2002)。一方で、マウスにおいて、APAP は CYP3A タンパク質発現量を

上昇させるが、CYP3A11 mRNA 発現量に影響を与えないという報告もある (Wolf et al., 2005)。また、ラットにおいて、APAP は CYP3A タンパク質発現量、酵素活性を上昇させる報告があり (Kim et al., 2007)、これらの結果を踏まえると、APAP は CYP3A の転写を促進させるだけでなく、タンパク質の分解を抑制し、ターンオーバーを遅らせることで酵素活性を上昇させている可能性も考えられた。

APAP の代謝経路には、UGT や SULT による抱合代謝と CYP1A2、CYP2E1 や CYP3A4 により生成する酸化代謝物である、N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI) がグルタチオン抱合を受ける代謝による解毒経路が知られている。しかし、APAP は過剰に服用すると反応性が高い NAPQI の生成量が増えることに伴う肝障害を引き起こすことが知られている (図1)。このような背景から、APAP を評価化合物に選択して、CYP3A タンパク質の分解制御と毒性との関連性について肝細胞3次元培養系を用いて調べた。

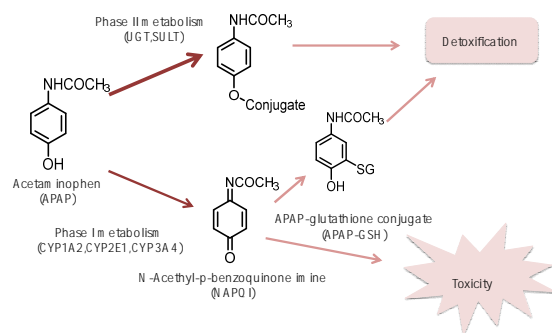


図1、APAP の代謝経路と毒性

3. 研究の方法

(1)細胞培養

雄性ラット(7週令)の肝臓から肝細胞を単離し3次元培養プレート(Elplasia™, Kuraray Co., Ltd.)と呼ばれる播種した。スフェロイドが形成される5日目以降から実験を行った。

(2)APAP による CYP3A に対する影響

肝細胞スフェロイドに APAP (1mM もしくは 10mM)を 24 時間曝露させ、CYP3A1/23 等の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR にて、タンパク質発現変化をウェスタンブロッティングにて調べた。また CYP3A1/23 の酵素活性は、P450-Glo™ CYP3A4 assay (Promega)を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 肝細胞3次元培養系の CYP3A1/23 のタンパク質発現

ラット肝臓から単離したラット肝細胞を 3次元培養プレートに播種し、スフェロイドが形成される5日目、および7日、9日目において、スフェロイド内の CYP3A1/23 タンパク質発現量は概ね一定に維持されていることが確認できた(図2)。

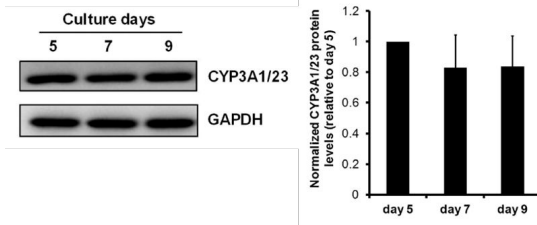


図 2、肝細胞スフェロイド形成時の CYP3A1/23 のタンパク発現変化

(2) APAP の CYP3A1/23 mRNA、タンパク質、酵素活性に与える影響

APAP (1, 10mM) 曝露により、CYP3A1/23 タンパク発現量は増加し、酵素活性も濃度依存的に上昇した (図 3A,B)。一方、mRNA 発現については、24 時間以内で発現の上昇は観察されず、概ね一定に維持していた (図 3C, 4)。

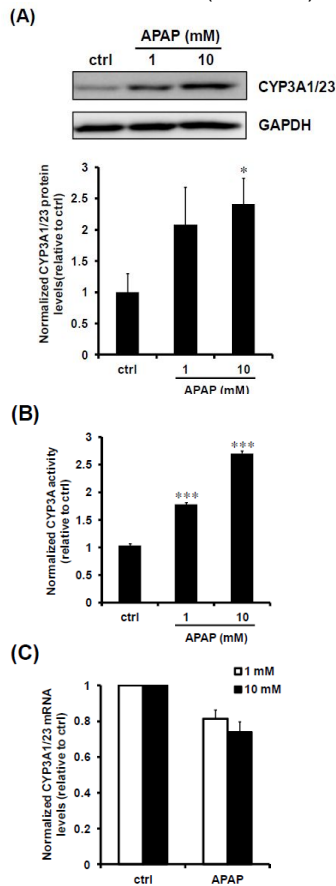


図 3、APAP (1, 10mM) をラット肝細胞スフェロイドに曝露後の CYP3A1/23 のタンパク発現量(A)、酵素活性(B)、および mRNA 発現量への影響(C)

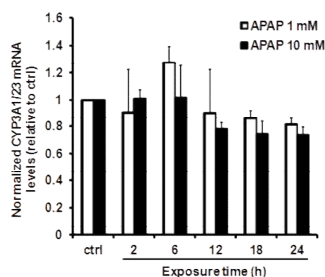


図 4、APAP をラット肝細胞スフェロイドに曝露後の各時点の mRNA 発現量への影響

(3) APAP が CYP3A1/23 のタンパク質の分解半減期に与える影響

(1)、(2) の結果から、APAP による CYP3A1/23 タンパク質発現量の上昇は mRNA に依存していない、つまり転写活性化によるものではなく CYP3A1/23 タンパク質の分解を抑制することに伴い、発現量が増加し酵素活性が上昇したものと考えられた。そこで、タンパク質翻訳阻害剤である cycloheximide (CHX) を添加することで、APAP による CYP3A1/23 のタンパク質分解半減期に与える影響を評価した。その結果、APAP (10mM) 曝露によって、分解半減期の延長が確認された (図 5)。

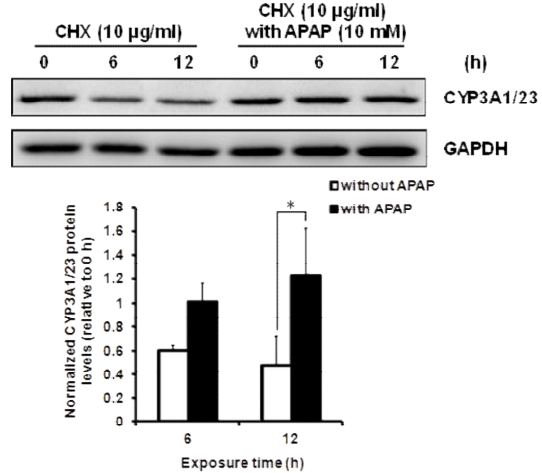


図 5、CHX 処理時、APAP による CYP3A1/23 のタンパク質分解半減期に与える影響

(4) APAP がプロテアソーム系に与える影響

CYP3A はユビキチンプロテアソーム系により分解されることから、APAP のプロテアソーム活性に及ぼす影響を調べた。APAP (10mM) は caspase 様活性を有意に減少させた。しかし陽性対照の MG132 に比べその減少程度は小さいことから、CYP3A1/23 の分解抑制の主たる原因ではない可能性が考えられる (data not shown)。

(5) APAP が CYP3A1/23 タンパク質のポリユビキチン化に与える影響

CYP3A1/23 を免疫沈降した画分で、APAP の濃度依存的にユビキチン化が抑制されていることが明らかとなった (図 6)。

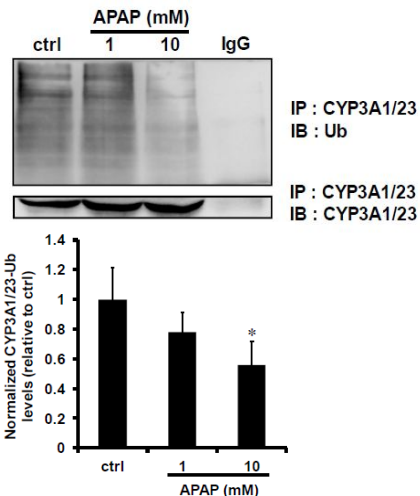


図 6, APAP が CYP3A1/23 タンパク質のポリユビキチン化に与える影響

CYP3A の E3 リガーゼである glycoprotein78 (gp78) と C terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) に対する APAP の影響を評価した。APAP は CHIP タンパク質発現量をほとんど変化させないものの、gp78 タンパク質においては APAP (10mM) で有意に減少させた (図 7)。しかしながら、gp78 の mRNA 量には変化を与えていなかった (図 8)。

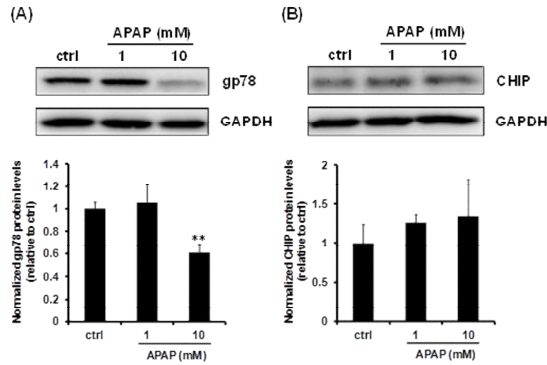


図 7, APAP による gp78 (A)と CHIP(B) タンパク質発現量に対する影響

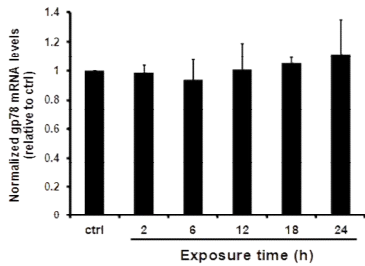


図 8, APAP による gp78mRNA 量発現への影響

(6) APAP による CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制による NAPQI や活性酸素種の影響

NAPQI の生成を抑制させるため、CYP 阻害剤 1-aminobenzotriazole (ABT) を添加したところ、APAP による CYP3A1/23 タンパク質のポリユビキチン化の阻害作用は ABT によって変化しなかった。また、APAP により減少した gp78 タンパク質も変化しなかった (data not shown)。N-Acetylcysteine (NAC) を APAP (10mM) と併用曝露しても CYP3A1/23 のタンパク質分解抑制作用は軽減されなかった。以上から、この現象に NAPQI や活性酸素種 (ROS) の関与は低いことが示唆された (図 9)。

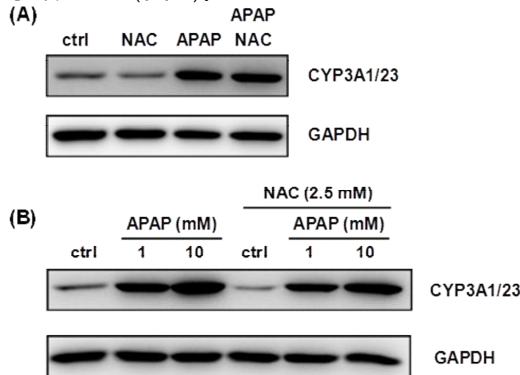


図 9, APAP による CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制による NAPQI, 活性酸素種の影響

(7) APAP 類縁体が CYP3A1/23 に及ぼす影響
APAP の位置異性体である *N*-acetyl-*m*-aminophenol (AMAP) や *N*-acetyl-*o*-aminophenol (AOAP)、および APAP の水酸基がカルボキシ基に置換された *p*-acetamidobenzoic acid (PacBA) を選択し、CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制について検討した (図 10)。

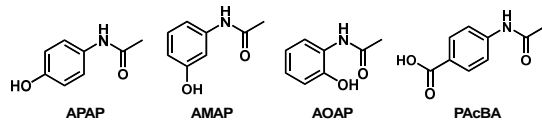


図 10, APAP 類縁体の化学構造式

AMAP (10mM) 曝露によって CYP3A1/23 のタンパク質発現量および酵素活性の増加が観察された。mRNA 発現量は 1mM 曝露で減少したものの、10mM で変化は見られなかった。AOAP (1mM) ではタンパク質発現量は変化せず、酵素活性は減少していた。また、PacBA については、10mM 曝露において、タンパク質発現量、酵素活性、mRNA 発現量において有意な減少が認められた。以上より、AMAP (10mM) は APAP と同様のプロファイルが得られ、同様のメカニズムで分解抑制に寄与している可能性がある (図 11)。

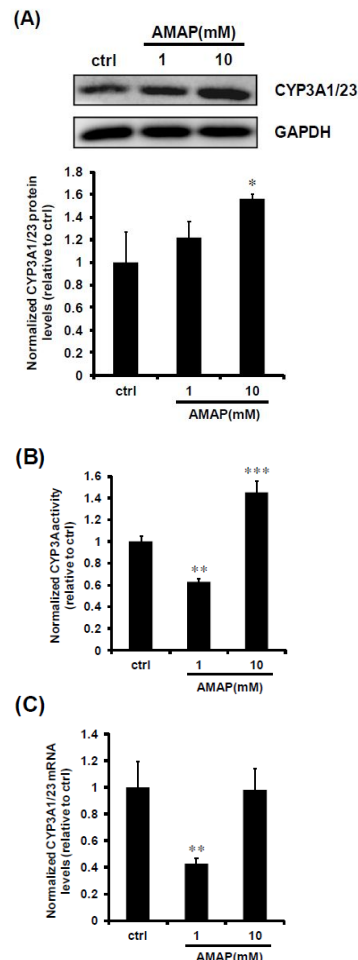


図 11, AMAP (1, 10mM) をラット肝細胞スフェロイドに曝露後の CYP3A1/23 のタンパク発現量(A)、酵素活性(B)、および mRNA 発現量への影響(C)

APAP は、CYP3A1/23 のユビキチンプロテアソーム系を E3 リガーゼ gp78 の発現量を減少させることで、その分解を抑制し、酵素活性の増加につながっていることを見出した。Gp78 のタンパク発現の減少についての原因は明らかとならなかったが、少なくとも APAP の代謝物や APAP による ROS の産生が原因ではなく、APAP 自身の作用によるものと示唆された。これは APAP の構造類自体 AMAP においても同様のプロファイルが得られたことから支持される。

また、以前の報告で (Sanoh et al., 2014)、本評価系に APAP (10mM) 曝露させると NAPQI 生成に基づく還元型グルタチオンの減少、生細胞の生存率の低下が観察された。NAPQI の生成は前述のように CYP3A が寄与していることから、本濃度での毒性は、CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制が寄与していることが考えられた。さらに評価化合物を増やし、構造活性相関を精査することでメカニズム解明につながることも期待される。

(8) その他の化合物の毒性の寄与

抗ヒスタミン薬ロラタジンは、CYP3A4 によってデスロラタジンに代謝変換される (図 12)。ロラタジンをスフェロイドに曝露するとリン脂質が蓄積することが確認された。また ABT を用いた評価から、デスロラタジンが主に寄与していることが示された (図 13)。ロラタジンは CYP3A の酵素活性を増加させることが明らかとなったが、mRNA レベルも上昇しており、この毒性には、タンパク分解ではなく、転写活性化による寄与が考えられた (data not shown)。

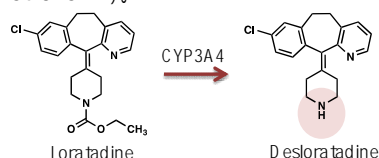


図 12, ロラタジンの代謝経路

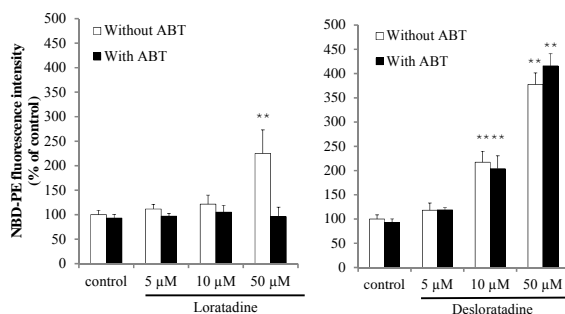


図 13, ロラタジン (左) および代謝物デスロラタジン (右) のラット肝細胞スフェロイドにおけるリン脂質蓄積に与える影響

これまで CYP3A を中心に評価してきたが、11- hydroxysteroid dehydrogenase の還元酵

素酵素の発現や活性も確認できたことから、酸化のみならず還元酵素とその分解、毒性との関連性も評価できる可能性もある (data not shown)。

(9) 肝臓以外の組織での可能性

主に肝臓での薬物代謝酵素に対する分解制御に関する研究を行ったが、肝臓以外の組織やもうひとつの分解システムにも着目する必要がある。例えば、パーキンソン病発症モデル作製に汎用される低分子化合物 MPTP の活性代謝物 MPP⁺ はオートファジー機能に与える影響を報告している (Miyara et al., 2016)。オートファジーで分解される薬物代謝酵素への影響や MPP⁺ による毒性寄与の研究につながると考えている。図 14 のような神経細胞の 3 次元培養系も有用となる可能性がある。

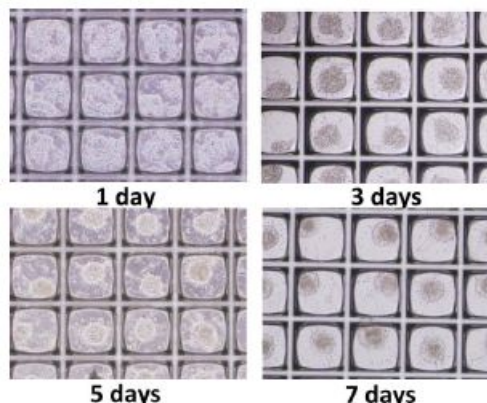


図 14, ラット大脳皮質由来神経細胞の 3 次元培養

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 3 件)

Santoh M, Sanoh S, Ohtsuki Y, Ejiri Y, Kotake Y, Ohta S. (2017) Acetaminophen analog N-acetyl-m-aminophenol, but not its reactive metabolite, N-acetyl-p-benzoquinone imine induces CYP3A activity via inhibition of protein degradation. *Biochem Biophys Res Commun*, 486(3):639-644. doi:10.1016/j.bbrc.2017.03.073. (査読有)

Santoh M., Sanoh S., Takagi M., Ejiri Y., Kotake Y., Ohta S. (2016) Acetaminophen induces accumulation of functional rat CYP3A via polyubiquitination dysfunction., *Sci Rep*. 6, 21373. doi: 10.1038/srep21373. (査読有)

Takagi M., Sanoh S., Santoh M., Ejiri Y., Kotake Y., Ohta S. (2016) Detection of Metabolic Activation Leading to Drug-induced Phospholipidosis in rat hepatocyte spheroids., *J Toxicol Sci*. 41, 155-64. doi: 10.2131/jts.41.155. (査読有)

(学会発表)(計13件)

佐能正剛, 一般シンポジウム「3次元培養およびヒト肝細胞移植キメラマウスを用いた肝臓における薬物代謝, 毒性評価」, 日本薬学会第137回年会, 2017年3月24日~27日, 仙台国際センター・東北大学川内地区(仙台市)

渡部祥子, 佐能正剛, 梅原祥太, 山頭征岳, 江尻洋子, 石田雄二, 加国雅和, 立野知世, 古武弥一郎, 太田茂, 「肝細胞の三次元培養系およびヒト肝細胞移植キメラマウスを用いたカチノン誘導体の共通代謝物の探索」, 日本薬学会第137回年会, 2017年3月24日~27日, 仙台国際センター・東北大学川内地区(仙台市)

佐能正剛, シンポジウム講演「アセトアミノフェンによるコピキチン化阻害を介した CYP3A タンパクの蓄積に基づく酵素活性の上昇 -新しい薬物間相互作用の可能性-」, 日本薬物動態学会第31回年会, 2016年10月13~15日, キッセイ文化ホール・松本市総合体育館(松本市)

采洋太朗, 古武弥一郎, 江尻洋子, 佐能正剛, 太田茂, 「毒性評価系構築を目指した3次元神経細胞培養系の検討」, フォーラム2016 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2016年9月10~11日, 昭和大学薬学部(東京都)

渡部祥子, 佐能正剛, 須山翔太, 梅原祥太, 山頭征岳, 江尻洋子, 古武弥一郎, 太田茂, 「カチノン誘導体における肝細胞三次元培養系を用いた共通代謝物の探索」, フォーラム2016 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2016年9月10~11日, 昭和大学薬学部(東京都)

佐能正剛, 渡部祥子, 須山翔太, 梅原祥太, 奥田勝博, 石田雄二, 加国雅和, 立野知世, 古武弥一郎, 太田茂, 「フェネチルアミン誘導体およびカチノン誘導体の in vitro/in vivo 薬物動態評価」, フォーラム2016 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2016年9月10~11日, 昭和大学薬学部(東京都)

佐能正剛, 渡部祥子, 梅原祥太, 山頭征岳, 江尻洋子, 古武弥一郎, 太田茂, 「ラット肝細胞3次元培養系を用いたカチノン誘導体の還元代謝活性」, 第43回日本毒性学会学術年会, 2016年6月29日~7月1日, ウィンクあいち(名古屋)

Santoh M, Sanoh S, Takagi M, Ejiri Y, Kotake Y, Ohta S, "Acetaminophen induces accumulation of functional rat CYP3A by altering gp78 localization." The 11th International ISSX Meeting, June12~16, 2016, BEXCO (Busan, Korea)

山頭征岳, 佐能正剛, 高木優志, 江尻洋子, 古武弥一郎, 太田茂, 「アセトアミノフェンが誘発するコピキチンプロテアソーム系阻害を介したラ

ットCYP3A1の蓄積」, 日本薬物動態学会第30回年会, 2015年11月12日~11月14日, タワーホール船堀(東京都)

高木優志, 佐能正剛, 山頭征岳, 江尻洋子, 太田茂, 「ラット肝細胞3次元培養における薬物代謝反応を考慮した薬剤誘発性リン脂質症評価」, 第42回日本毒性学会学術年会, 2015年6月29日~7月1日, 石川県立音楽堂(金沢市)

高木優志, 佐能正剛, 山頭征岳, 太田茂, 「ラット肝細胞スフェロイド培養における医薬品代謝物を考慮に入れた薬剤誘発性リン脂質症評価」, 日本薬学会第135年会, 2015年3月25日~3月28日, 神戸学院大学, デザイン・クリエイティブセンター他(神戸市)

高木優志, 佐能正剛, 山頭征岳, 江尻洋子, 太田茂, 「ラット肝細胞3次元培養系による蛍光プローブを用いた薬剤誘発性リン脂質症評価系の構築」, 第53回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2014年11月8日~11月9日, 広島国際会議場(広島市)

Santoh M, Sanoh S, Takagi M, Ejiri Y, Ohta S, "Comparison of the correlation between CYP3A activity and protein expression in spheroid and monolayer culture", 2014年10月19日~10月23日, Hilton San Francisco Union Square Hotel (San Francisco, USA).

{その他}

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/ohtalab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 茂(OHTA SHIGERU)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(薬)・教授

研究者番号: 60160503

(2) 研究分担者

佐能 正剛(SANOH SEIGO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(薬)・助教

研究者番号: 00552267

古武 弥一郎(KOTAKE YAICHIRO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(薬)・准教授

研究者番号: 20335649