

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860098

研究課題名(和文)薬の副作用発症に関わるオーファン加水分解酵素の機能解析

研究課題名(英文) Involvement of orphan esterases in side effects of drugs: acebutolol and ketoconazole

研究代表者

深見 達基 (Fukami, Tatsuki)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：00532300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：加水分解反応が毒性発現に関与することが示唆されているものの、未だどの酵素により触媒されるか知られていない医薬品が存在する。本検討では2種の医薬品に注目し、加水分解酵素の同定及び毒性発現への関与を解析した。アセプトロールの副作用としてエリテマトーデスが知られている。ヒトにおいてアセプトロールはカルボキシルエステラーゼ2により効率的に加水分解され、その後にシトクロムP450 2C19により副作用を示す代謝物へ変換されることを明らかにした。ケトコナゾールは経口摂取時の副作用として肝障害が知られており、アリルアセタミドデアセチラーゼによる加水分解反応が毒性発現に重要なステップであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to clarify the identification of esterases responsible for toxicities of two clinical drugs, acebutolol and ketoconazole. Lupus erythematosus and hepatotoxicity are known as side effects of acebutolol and ketoconazole, respectively. We found that acebutolol is hydrolyzed to acetolol by carboxyl esterase (CES) 2, followed by N-hydroxylation of acetolol by Cytochrome P450 (CYP) 2C19. Involvement of this metabolic pathway in acebutolol-induced toxicity was clarified using mice co-administered with CES and P450 inhibitors or inducers by evaluation of anti-nuclear antibody in plasma. Ketoconazole was specifically hydrolyzed to N-deacetyl ketoconazole by arylacetamide deacetylase (AADAC) in human liver. The involvement of AADAC in ketoconazole-induced toxicity was clarified using human hepatoma HepaRG cells with overexpression of human AADAC. These results would provide useful information for clinical and drug development.

研究分野：薬物代謝

キーワード：薬物代謝 加水分解酵素 薬物毒性

### 1. 研究開始当初の背景

臨床で使用されている薬の約 10%は加水分解されることで薬効を失ったり、獲得したりするだけでなく、加水分解産物が毒性を発揮する原因物質となる場合もある。このように加水分解反応は薬物動態学的及び毒性学的に重要であるにも関わらず、その反応を担う酵素の研究はシトクロム P450 やグルクロン酸転移酵素に比べて非常に遅れている。加水分解を受けることでその代謝産物が肝障害や腎障害、メトヘモグロビン血症などの副作用の原因となることが示唆されていながらも、それが実験学的に証明された例はほとんどなかった。薬の加水分解の理解の遅延をもたらす最大の原因は、カルボキシルエステラーゼ(CES)以外の多岐にわたる加水分解酵素の機能や基質特異性などが解明されていないことがある。

申請者はこれまでに、前立腺癌治療薬フルタミド、解熱鎮痛薬フェナセチン及び結核治療薬リファンピシン、リファブチン及びリファペンチンの加水分解反応にアリルアセタミドデアセチラーゼ(AADAC)が関与することを明らかにしてきた。フルタミドの副作用である肝障害及びフェナセチンの副作用メトヘモグロビン血症には加水分解反応が関与するため、AADAC は毒性発現をコントロールする酵素とわかる。また、様々な毒性発現に関与すると考えられているアシルグルクロニドの加水分解反応を $\alpha/\beta$ ヒドロラーゼドメインコンテイング 10(ABHD10)が触媒することをミコフェノール酸やプロベネシドのアシルグルクロニドに注目して解明してきた。このように、CES 以外にも薬物の加水分解反応に関与する酵素が数多く存在する可能性、及びAADAC やABHD10等の新規酵素が他にも多くの薬物を加水分解する可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

上記のように薬物代謝に関与すると推察される加水分解酵素は多く存在する可能性がある。また、近年機能同定された加水分解酵素についても基質報告例が少ないため基質特異性が不明なままであった。これらの機能を明らかにし、副作用や薬物間相互作用を回避する必要がある。

加水分解反応が毒性発現につながることを示唆されていながらもその責任酵素が不明な薬物は未だ多く存在する。例えば、アセプトロールの加水分解はエリテマトーデス、ケトコナゾールの加水分解は肝障害と関連することが示唆されていた。本課題では、毒性発現に加水分解反応が関与することが示唆されているアセプトロールとケトコナゾールに注目して、その責任酵素を同定し、毒性発現に対する加水分解酵素の関与を検討した。

### 3. 研究の方法

薬物代謝の主要臓器であるヒト肝臓よりミクロソームやサイトゾルなどの画分を調製し、アセプトロール及びケトコナゾールの加水分解酵素活性を HPLC もしくは LC-MS/MS を用いて評価した。また、当研究室にて保有している CES、AADAC や ABHD10 の発現系を用いても酵素活性を測定した。もしいずれの発現系においても酵素活性が認められなかった場合はタンパク質精製を行うこととした。

アセプトロールやケトコナゾールを加水分解する酵素が生体内で毒性発現に関与しているか検討するために次に示す *in vivo* 及び *in vitro* 検討を行った。(1) *In vivo*: マウスもしくはラット肝臓を用いて加水分解酵素活性を測定し、ヒトと同様の酵素活性を示す動物種を選定した。当該酵素の阻害剤を投与して加水分解酵素の機能を低下させた実験動物にアセプトロールを単回もしくは連続投与することにより、毒性発現が抑制されるか評価した。アセプトロールで認められるエリテマトーデスを評価する際、血漿中の抗核抗体量や種類を蛍光抗体法の原理に基づいて測定する HEPANA テストや、抗体産生細胞が多く存在する脾臓の重量を測定した。(2) *In vitro*: 薬物代謝酵素やトランスポーターの発現が比較的維持されていることが知られている HepaRG 細胞に薬物を処置し、細胞生存率を測定することで、細胞障害性を評価した。当該加水分解酵素の発現が低かった場合は、アデノウイルス感染能を利用して HepaRG 細胞に酵素を過剰発現させた。

### 4. 研究成果

はじめにアセプトロール加水分解酵素活性をヒト肝臓画分を用いて測定した結果、ミクロソーム画分において高い酵素活性が認められた。発現系を用いた結果、CES1、CES2 及び AADAC 全ての酵素で酵素活性が認められたものの、CES2 が最も高い加水分解効率を示し、肝臓ミクロソームで認められた  $K_m$  と近似した値を示した。ヒト肝臓ミクロソームにおける酵素活性に対する阻害実験でも、ヒト CES2 に特徴的な阻害プロファイルを示した。アセプトロールの主代謝物は加水分解産物(アセトロール)がアセチル化されて生成するジアセトロールであり、発現系を用いた解析の結果、NAT2 により触媒されることを明らかにした。エリテマトーデスの原因物質としてアセトロールが水酸化されて生成する *N*-水酸化アセトロールが考えられた。水酸化酵素として P450 の可能性を考慮し発現系を用いて水酸化代謝物を *N*-アセチルシステイン付加体として測定した結果、CYP2C19 が最も高いアセトロール水酸化効率を示した。

CES 酵素活性は一般的にラットよりマウスにおいて高いため、*in vivo* 検討はマウスを用いて行った。雌性 C57BL/6 マウスにアセプトロール(100 mg/kg, p.o.)を30日間投与し

た結果、血漿中抗核抗体が認められ、P450 誘導剤である pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile を共投与することにより抗核抗体量の増加が認められた。抗核抗体量は CES 阻害剤 tri-*o*-tolylphosphate 及び P450 阻害剤 1-aminobenzotriazole 共投与により減少した。脾臓重量も pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile の共投与により増大が認められたが tri-*o*-tolylphosphate 及び 1-aminobenzotriazole 共投与によりその増大は抑制された。以上より、アセプトロールの副作用であるエリテマトーデスには加水分解、その後の水酸化反応が関与することを明らかにした。NAT2 は解毒酵素として考えられ、遺伝的多型の存在が知られている。CES2、CYP2C19 及び NAT2 の酵素活性のバランスが毒性感受性を左右しているのかもしれない。

続いてケトコナゾール加水分解について解析したところ、ヒト肝臓ミクロソームにおいて活性が認められ、発現系を用いた解析では AADAC においてのみ酵素活性が認められた。両者において速度論的解析を行った結果、類似した Km 値を示した。また、ヒト肝臓ミクロソームにおける酵素活性に対して様々な阻害剤を用いて阻害実験を行ったところ、AADAC に特徴的な阻害プロファイルを示した。以上より、ケトコナゾールは AADAC により加水分解されることを明らかにした。さらに、加水分解代謝物 *N*-デアセチルケトコナゾールは FMO3 により *N*-水酸化されることも明らかにした。

*N*-デアセチルケトコナゾールの *N*-水酸化産物が細胞毒性を引き起こすことがラット肝細胞を用いた検討より示唆されており、ヒトにおいても加水分解を起点とした一連の代謝反応がケトコナゾールの細胞毒性につながるか、HepaRG 細胞を用いて検討した。HepaRG 細胞は様々な薬物代謝酵素の発現を維持していることが知られており、FMO3 の発現もヒト肝細胞と同等であることが報告されている。*N*-デアセチルケトコナゾール処置により濃度依存的な細胞生存率の低下が認められたがケトコナゾールでは認められなかった。AADAC の特異的基質であるフルタミドの加水分解酵素活性を測定した結果、HepaRG 細胞はヒト肝細胞と比較して顕著に低い活性を示したため、ケトコナゾールで細胞生存率の低下が認められなかったのは AADAC の発現が低いためと考えられた。そこでアデノウイルス感染能を使用して HepaRG 細胞に AADAC を過剰発現させた結果、ケトコナゾールによる細胞生存率の低下が認められた。なお、過剰発現させた際の AADAC 発現量はヒト肝細胞と同等であった。以上より、AADAC を起点とする代謝反応がケトコナゾール毒性に関与していることを明らかにした。

本研究で明らかにした結果は、臨床及び医薬品開発において有用な情報を提供する。

## 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) Kyotaka Muta, Tatsuki Fukami, and Miki Nakajima. A proposed mechanism for the adverse effects of acebutolol: CES2 and CYP2C19-mediated metabolism and antinuclear antibody production. *Biochem. Pharmacol.*, 98:659-670, 2015. 査読有
- (2) Tatsuki Fukami, Motoki Kariya, Takaya Kurokawa, Azumi Iida, and Miki Nakajima. Comparison of substrate specificity among human arylacetamide deacetylase and carboxylesterases. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 43:1450-1457, 2015. 査読有

[学会発表](計 5 件)

- (1) 深見達基、飯田あずみ、山田卓也、中島美紀 ケトコナゾールによる肝毒性発現に対するヒト AADAC の関与 第 42 回日本毒性学会学術年会 平成 27 年 6 月 29 日-7 月 1 日 ポスター 金沢
- (2) 飯田あずみ、深見達基、中島美紀 ケトコナゾール加水分解酵素の肝毒性発現に対する関与 日本薬学会第 135 年会 平成 27 年 3 月 25 日-28 日 ポスター 神戸
- (3) Tatsuki Fukami, Motoki Kariya, Takaya Kurokawa, Azumi Iida, and Miki Nakajima. Comparison of substrate specificity between human arylacetamide deacetylase and carboxylesterases. 19th North American ISSX Meeting and 29th JSSX Annual Meeting October 19-23, 2014, Poster, California, USA.
- (4) 深見達基 医薬品副作用に関与する新規加水分解酵素の役割 平成 26 年 7 月 2 日-4 日 シンポジウム 神戸
- (5) 牟田恭亮、深見達基、中島美紀  $\beta$ 遮断薬アセプトロールの毒性発現における薬物代謝の役割 第 41 回日本毒性学会学術年会 平成 26 年 7 月 2 日-4 日 ポスター 神戸

[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〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~taisha/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

深見 達基 (FUKAMI, Tatsuki)

金沢大学・医薬保健研究域薬学系・准教授

研究者番号：00532300

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし