

機関番号：13301
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2009～2010
課題番号：21790148
研究課題名（和文）ヒトオーファンカルボキシエステラーゼの薬物動態および毒性発現における関与
研究課題名（英文）Involvement of human orphan carboxylesterase in drug metabolism and toxicity
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

研究成果の概要（和文）：ヒトアリルアセタミドデアセチラーゼ(AADAC)が肝毒性や腎毒性が副作用として報告されている前立腺癌治療薬フルタミド、解熱鎮痛薬フェナセチン、抗結核薬リファマイシンの加水分解を触媒することを明らかにし、薬物代謝においてもAADACが重要であることを明らかにした。また、HNF4・、SHP、FXRなどの転写因子および核内受容体を介して胆汁酸によりAADAC発現量が低下することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrated that human arylacetamide deacetylase (AADAC) catalyzes the hydrolysis of flutamide, phenacetin, and rifamycins, which are reported to be associated with toxicity. In addition, it was found that the expression level of AADAC mRNA was decreased by bile acid through the repression of HNF4a activity by FXR-induced SHP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：薬物代謝

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、薬物毒性

1. 研究開始当初の背景

肝ミクロソーム(HLM)に発現している主なセリンエステラーゼはカルボキシエステラーゼ(CES)1/2とAADACである(*J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 21:187-96, 2007)。AADACは2-acetylaminofluorene (*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177:453-9, 1991)、triacylglycerol (*Biochem. Biophys. Acta.*, 1483:37-57, 2000)やcholesterol ester (*EMBO J.*, 26:5109-19, 2007)を加水分解することが知られているが、薬物代謝

に対する関与はほとんど知られていない。

前立腺癌治療薬フルタミドは肝臓において主にCYP1A2により水酸化反応を受けて抗癌作用を示すが、他の主要経路としてアミド結合の加水分解反応がある。フルタミドの副作用として重篤な肝障害が知られているが、Cyp1a2 knockout mouseでは加水分解産物であるFLU-1の尿中排泄量がwild typeと比較して増加しており、アミノ酸欠乏食を与えると肝障害が増強することが報告されている(*J. Gastroenterol.*,

41:231-9, 2006)。また、血漿中 FLU-1 濃度が高い患者ほど肝毒性発症率が高いことも報告されており (*Mol. Cell. Biochem.* 252:149-56, 2003)、フルタミドの加水分解経路が毒性に関与している可能性が考えられる。フェナセチンは CYP1A2 により脱エチル化されてアセトアミノフェンに変換されるが、メトヘモグロビン血症や腎毒性を引き起こすため販売中止となった。フェナセチン誘発性副作用の原因として加水分解により生じた *p*-フェネチジンによる毒性が考えられている。しかしこれらの薬物の加水分解に CES1/2 は関与しない (*Biol. Pharm. Bull.*, 20:869-73, 1997)。以上のような背景から、HLM には薬物代謝において主要な酵素である CES 以外に重要な加水分解酵素が存在しており、その酵素として AADAC に焦点をあてた本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

薬物代謝に重要な酵素である CES は、薬物のエステル結合およびアミド結合を加水分解することが知られており、この酵素を利用したプロドラッグが多く開発されている。主な分子種は CES1 と CES2 (CES1/2) であり、CES1 は高血圧治療薬イミダプリル等の ACE 阻害薬、CES2 は抗癌薬の塩酸イリノテカンを加水分解することが知られている。しかし、前立腺癌治療薬フルタミドや販売中止となった解熱鎮痛薬のフェナセチンは HLM において加水分解を受けることが知られているが、CES1 や CES2 は関与しないことが報告されている。よって、HLM において CES1/2 以外に薬物代謝 (加水分解) に関与する酵素の存在が示唆される。その酵素として AADAC に注目した。しかし、AADAC について研究例が少ないため、薬物代謝に関与するかどうか不明である。本研究では AADAC が CES1/2 と同様に薬物の加水分解に関与している可能性について明らかにすることを目的とした。AADAC の機能を明らかにすることで薬物動態の理解を深めることができると考えた。

3. 研究の方法

AADAC が薬物加水分解に関与することを直接的に示すには、単独発現系を用いた酵素活性の評価が不可欠である。そこで、操作が簡便で大量に目的タンパク質を得ることが可能なバキュロウイルスを用いて Sf21 細胞に感染させる方法により AADAC 発現系を作製した。酵素活性の比較対象として CES1、CES2 の発現系も作製した。ここで確立した発現系を以下の酵素活性測定に酵素源として用いる。

上記で確立した AADAC 単独発現系を用い

てフルタミドおよびフェナセチンの加水分解酵素活性を CES1 と CES2 単独発現系と比較しながら評価した。さらに、生体内において AADAC が実際にこれらの薬物の加水分解反応に寄与していることを明らかにするため、肝ミクロソームおよびサイトゾルを用いて反応の速度論的解析を行った。AADAC は HLM に発現していることが報告されているため、サイトゾルにおいて活性がほとんど見られず、ミクロソームにおいて高い活性が認められることが予想された。また、様々なセリンエステラーゼや他の加水分解酵素阻害剤によるフルタミドとフェナセチン加水分解酵素活性の阻害程度を単独発現系と HLM で検討し、AADAC 単独発現系を用いたときと肝ミクロソームを用いた際に阻害形式が一致するか確認した。肝臓のみならず、他の臓器でも AADAC が発現している可能性が考えられるため、様々な臓器における AADAC の発現をウェスタンブロッティングにより解析し、各臓器ミクロソームを用いて加水分解酵素活性を測定した。AADAC が関与しているならば、発現が認められた臓器において活性が検出されるべきである。さらに AADAC がフルタミドやフェナセチン以外の薬物の加水分解反応にも関わっている可能性を考えて、候補薬物であるプラゾシンやテラゾシン、リファマイシンなどの薬物の加水分解酵素活性を AADAC 単独発現系を用いて解析した。

AADAC の活性部位は脂質加水分解酵素である Hormone-sensitive lipase (HSL) と類似していることからコレステロールエステルの加水分解を担う酵素として研究がなされていた。よって AADAC はコレステロール代謝物である胆汁酸により発現制御を受ける可能性が考えられた。まずヒト由来細胞株を用いて AADAC が発現している細胞株を探索した。発現が確認された細胞株やヒト初代培養肝細胞に farnesoid X receptor (FXR) のリガンドであるケノデオキシコール酸を処置することにより mRNA の発現量の変動をリアルタイム PCR により検討した。AADAC 遺伝子上流に FXR response elements (FXRE) が存在するかコンピュータ解析を行い、その領域が機能的に働くことを証明するため、レポータープラスミド pGL3 vector に様々な長さの AADAC 上流領域を組み込んで細胞内に導入し、ケノデオキシコール酸を処置して誘導率の差異を解析した。このように内因性リガンドが AADAC を介して薬効や毒性発現に関与している可能性を見出した。

4. 研究成果

AADAC、CES1A1、CES1A2 および CES2 のバキュロウイルス発現系を作製し、フルタミ

ド加水分解酵素活性を測定した結果、AADACのみがフルタミド加水分解酵素活性を示した。HLM と AADAC 発現系を用いたフルタミド加水分解酵素活性に対する阻害実験、様々な臓器における AADAC 発現と加水分解酵素活性の有無の比較や個人 HLM における AADAC タンパク質発現量と加水分解酵素活性の相関実験からも AADAC がフルタミド加水分解反応を触媒する主な酵素であることを明らかにした。フルタミドの他に、解熱鎮痛薬フェナセチンも加水分解産物と腎毒性の関連が報告されており、現在はその毒性を理由に使用されていない。しかし、フェナセチンの構造類似体であるアセトアミノフェンは現在も臨床で使用されており、体内で加水分解反応が起こりにくいと考えられている。本検討で AADAC がフェナセチンの加水分解反応を触媒する主要酵素であることを明らかにし、AADAC は HLM と同様にアセトアミノフェンの加水分解能が非常に低いことも明らかにした。このように AADAC のフェナセチンとアセトアミノフェンに対する基質特異性の違いが毒性発症頻度に影響を与えていることが考えられた。さらに、同様な解析によりリファマイシン系薬物（リファンピシン、リファブチンおよびリファペンチンなど）も AADAC により特異的に加水分解を受けることを明らかにした。リファマイシンは様々な薬物代謝酵素誘導能や細胞毒性を有していることが知られているが、加水分解代謝物はこれらの性質をほとんど示さなかった。これはアデノウイルスの有する感染能を用いて AADAC を過剰発現させたヒト肝癌由来細胞 HepG2 細胞にリファンピシンを処置すると酵素誘導能や細胞毒性が減少したことにより支持された。このように毒性学的に AADAC は重要であり、AADAC 発現量の体内変動は薬物毒性発現に大きな影響を与えることが考えられた。

AADAC の発現が認められたヒト肝癌由来細胞 HuH7 細胞に胆汁酸のケノデオキシコール酸を処置したところ AADAC mRNA 発現量の低下が認められた。ルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイなどの手法を組み合わせ、AADAC 遺伝子の 5' - 上流領域には転写因子 hepatocyte nuclear factor (HNF) 4・の結合領域が存在し、HNF4・の機能を抑制する short heterodimer partner (SHP) の発現をケノデオキシコール酸が FXR を介して抑制することにより AADAC 発現量低下が引き起こされることを明らかにした。

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 4 件)

- ① Watanabe, A., Fukami, T., Takahashi, S., Kobayashi, Y., Nakagawa, N., Nakajima, M., and Yokoi, T. Arylacetamide deacetylase is a determinant enzyme for the difference in hydrolase activities of phenacetin and acetaminophen. 38(2010), 1532-1537, 査読有
- ② Fukami, T., Takahashi, S., Nakagawa, N., Maruichi, T., Nakajima, M., and Yokoi, T. In vitro evaluation of inhibitory effects of antidiabetic and antihyperlipidemic drugs on human carboxylesterase activities. 38(2010), 2173-2178, 査読有
- ③ Watanabe, A., Fukami, T., Nakajima, M., Takamiya, M., Aoki, Y., and Yokoi, T. Human arylacetamide deacetylase is a principle enzyme in flutamide hydrolysis. 37(2009), 1513-1520, 査読有
- ④ Maruichi, T., Fukami, T., Nakajima, M., and Yokoi, T. Transcriptional regulation of human carboxylesterase 1A1 by nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 (Nrf2). 79(2009), 288-295, 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

- ① 渡邊旭延, 深見達基, 中島美紀, 高宮正隆, 青木康博, 横井毅 ヒトアリアルセタミドデアセチラーゼのフルタミド加水分解に対する関与, 日本薬物動態学会第 24 回年会, 2010 年 11 月 27-29 日, 国立京都国際会館 (京都府)
- ② 丸一泰雅, 深見達基, 中島美紀, 横井毅 ヒトカルボキシルエステラーゼ 1A の Nrf2 による転写調節, 日本薬物動態学会第 24 回年会, 2010 年 11 月 27-29 日, 国立京都国際会館 (京都府)
- ③ 深見達基, 高橋志織, 中川尚, 中島美紀, 横井毅 糖尿病および高脂血症治療薬のヒトカルボキシルエステラーゼ酵素活性に対する阻害効果, 日本薬物動態学会第 24 回年会, 2010 年 11 月 27-29 日, 国立京都国際会館 (京都府)
- ④ 深見達基, 渡邊旭延, 高橋志織, 小林祐喜, 中川尚, 中島美紀, 横井毅 フェナセチンおよびアセトアミノフェンによる毒性の差異に対するヒトアリアルセタミドデアセチラーゼの重要性, 日本薬物動態学会第 25 回年会, 2010 年 10 月 7-9 日, 大宮ソニックシティ (埼玉県)
- ⑤ 中島彰紀, 深見達基, 渡邊旭延, 小林祐喜, 中島美紀, 横井毅 ヒトアリアルセタミドデアセチラーゼはリファマイシン系薬物の加水分解を担う主代謝酵

素である，日本薬物動態学会第 25 回年会，2010 年 10 月 7-9 日，大宮ソニックシティ（埼玉県）

- ⑥ 小林祐喜，深見達基，中島彰紀，渡邊旭延，中島美紀，横井毅 マウス、ラット及びヒトにおけるアシルアセタミドデアセチラーゼの発現臓器及び酵素活性の種差に関する検討，日本薬物動態学会第 25 回年会，2010 年 10 月 7-9 日，大宮ソニックシティ（埼玉県）
- ⑦ Fukami. T, Watanabe. A, Takahashi. S, Nakagawa. N, Nakajima. M, and Yokoi. T. Arylacetamide deacetylase is a determinant enzyme for the difference in hydrolase activities of phenacetin and acetaminophen. 9th International ISSX Meeting, 2010. 9. 4-8, Istanbul Convention and Exhibition Centre (Turkey)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし