

第6回 基礎・臨床融合の学内共同研究発表会

薬効・薬物動態研究の最前線 ～シトクローム P450 と

UDP-グルクロン酸転移酵素発現系を用いた迅速な薬物代謝解析の臨床応用～

日時 平成 23 年 11 月 14 日 (月曜) 16 時 30 分～18 時

場所 管理棟 3 階 大会議室

研究責任者 佐藤 浩

丸尾良浩

司会 佐藤 浩

口演者と演題

1. 丸尾良浩 (小児科学講座)

グルクロン酸転移酵素ファミリーの

共通エクソン変異が薬剤のグルクロン酸抱合に及ぼす影響

2. 寺田智祐 (薬剤部)

個の薬物療法を目指した臨床薬理学アプローチ

3. 生城真一 (生命科学講座客員)

シトクローム P450 と UDP-グルクロン酸転移酵素発現系を用いた

迅速な薬物代謝解析の臨床応用

はじめに

服部副学長の開会の挨拶があり、臨床から 27 名、基礎医学と大学院生など 17 名、合わせて 44 名の参加のもとに研究発表会が開催された。本会は昨年 11 月 29 日に開催された第 1 回の「UDP-グルクロン酸転移酵素多型による薬剤代謝への影響と副作用発現の予測の研究」に続く、第 2 回の発表会であり、その後の 1 年間の新たな研究成果が報告された。

薬剤部の寺田教授から、副作用を十分に検討していない新薬が、ドラッグラグ解消のために承認されており、その有効性と安全性が販売後の調査に委ねられている現状が報告された。今後のオーダーメイド薬物療法実施には、基礎と臨床が協力した薬の血中濃度や遺伝子解析による基本データの蓄積が必須であることを、腎がんと糖尿病治療薬で得られた研究から具体的に指摘された。小児科学講座の丸尾講師からは、グル

クロン酸転移酵素 UGT1 の遺伝子の共通エクソンに見いだされた変異が、臨床でよく使われる acetaminophen など、主に UGT1 で抱合される薬の代謝に及ぼす影響を調べた結果が報告された。多くの薬は UGT1 の複数のアイソフォームの共通基質になっていること、そして、今回見つかった共通エクソンの変異が全アイソフォームの活性を低下させることが示された。個々の患者の遺伝的特性に合った治療を実現するには、現在行われている個々のアイソフォームでの検討ではなくて、投与する薬の代謝に関わる全アイソフォームを含め網羅的に検討することの重要性が指摘された。生命科学講座の生城客員准教授は、丸尾らが日本人に見いだした UGT1A5 の新規遺伝子多型による変異酵素は、薬物によっては野生型酵素の数十倍の活性を示すことが分かり、十分に研究されていない UGT1A5 が、UGT1A3 や UGT1A4 とともに薬物代謝に寄与してい

ることを明らかにした。また、UGT 発現系を用いて、新規に開発された尿酸生成抑制剤のフェブキシソスタットが、UGT1A1, 1A8 及び 1A9 により抱合を受けることを明らかにした。両研究で、これまでに生城客員准教授が融合研究のために作製したヒト UGT 発現系が著しく有効であることが実証された。一方、UGT 発現酵母菌体を用い安定、かつ簡便なアシル抱合体が合成できることを示し、この系は臨床での薬物濃度測定の基本となる標準物質作成に有用であることも報告された。

討論では本研究による特許取得の可能性と今後の製薬会社との共同研究のあり方について質問があり、討議が行われた。

UDP-グルクロン酸転移酵素 1 型ファミリー共通エクソン変異 (p. 364L) の薬剤代謝に及ぼす影響

丸尾良浩、三村由卯

滋賀医科大学小児科

Effect of a mutation in the common exon (p.P364L) of the human UDP-glucuronosyltransferase 1 family on drug metabolism

Yoshihihiro Maruo, Yu Mimura

Departments of Pediatrics' Shiga University of Medical Science

はじめに

UDP-グルクロン酸転移酵素ファミリーは薬剤代謝の第2相を担う主要な酵素である。これまでに私たちはこの酵素群の多型を発見し、薬剤代謝への影響を明らかにしてきた[1]。UGT1 サブファミリーの薬剤代謝に影響を及ぼす遺伝子多型・変異のこれまでの研究はUGT1 のエクソン1 についてのみであった。しかし、UGT1 においては、共通エクソンの多型・変異が薬剤代謝に大きな影響をおよぼすと考えられる。今回、私たちはUGT1 共通エクソンの p. P364L 変異が薬剤代謝に及ぼす影響を検討した[2]。

UDP-グルクロン酸転移酵素(UGT)ファミリーには17のアイソフォームが存在する。これら酵素により膨大な数の薬剤や、生体内物質の代謝・解毒が行われている。タンパク構造の類似性により1型(UGT1)と2型(UGT2)のサブファミリーに分けられる。なかでもUGT1 にはUGT1A1-UGT1A10の九つのアイソフォームが属する。UGT1 はユニークな遺伝子構造をもち、基質特異性を決めるエクソン1が各アイソフォームの数だけ存在し、選択的スプライシングにより、共通エクソン2-5とmRNA レベルでつなぎ合わせることで生成される(図1)。

これまで私たちは、日本人における1型ファミリー(UGT1A1-UGT1A9)の多型を発見し、薬剤代謝への影響を明らかにしてきた。我々の研究を含め、UGT1の多型の研究は各エクソン1に存在するものに限られることが多く、共通エクソンにおける変異がUGT1全体にどの

ような影響を与えるかについての検討はほとんどされていなかった。今回、私たちグループがこれまでに発見報告してきた、UGT1の共通エクソン4に存在するc. 1091C>T:p. P364L変異について検討した。

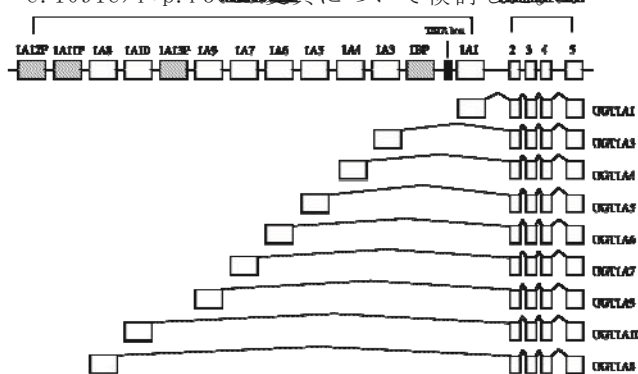


図1 UGT1の選択的スプライシング

UGT1 共通エクソンの多型解析

健康ボランティア 187 人の末梢血リンパ球より、PCR法にてUGT1の共通エクソン2-4を増幅、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。187人中2人にp. P364L変異を同定した。ヘテロ接合体であった。これより日本人におけるp. P364Lの頻度は0.0053であることが明らかになった。p. P364Lは遺伝子多型ではな

かったが、比較的頻度の高い変異であることが明らかになった。

p. P364L をもつ UGT1 アイソフォームの薬 剤代謝に及ぼす影響の検討

UGT1 各アイソフォームの発現臓器の cDNA より PCR 法で増幅し、p. CR3.1 にライゲーションし野生型の発現ベクターを作成した。Mutan Km kit を用い site directed mutagenesis 法で、各野生型 UGT1 の発現ベクターに p. P364L 変異 (1091C>T) を導入した。

リポフェクション法で作成した発現ベクターを COS7 細胞に取り込ませ、すべての UGT1 アイソフォームにおいて野生型と変異型 (p. P364L) を発現させた。

発現させた各 UGT1 に β -estradiol、acetaminophen、propofol、lamotrigine など、臨床現場で頻用され、かつ UGT1 により主として代謝・解毒される薬剤を反応させ、高速液体クロマトグラフィー並びに薄層クロマトグラフィーを用いグルクロン酸抱合された薬剤を測定し、代謝活性の変化を検討した。

β -estradiol は UGT1A1、1A3、1A7、1A8、1A10 で代謝された。p. P364L により 1A1、1A7、1A8、1A10 の活性が 26.5%~42% に酵素活性が低下した。一方で 1A3 においては酵素活性の低下を認めなかった。acetaminophen においては、1A1、1A6、1A9 に P364L 変異が存在すると 5%~50% に酵素活性が低下した。Propofol においては 1A7、1A8、1A9、1A10 において 21.9~71.2% に酵素活性が低下した。Lamotrigine は 1A4 のみ代謝され、野生型で認めていた UGT1 A4 の基質阻害が解除された。この現象は imipramine、cyproheptadine でも同様に基質阻害の解除が認められた。

p. P364L は健康日本人において遺伝子頻度が 0.0053 であり比較的頻度の高い変異であり、ほとんどのアイソフォームで酵素活性の低下を招いた。UGT1A ファミリーは非常に多くの薬剤、内因性ホルモン、植物性フラボノイドや発がん物質などを代謝しており、副作用や疾病の発現を考えるにあたり重要な変異である。この結果は共通エクソンに存在する変異の重要性をも示している。個々の患者の遺伝的特性に合った治療を実現化するには UGT1 共通エクソンを含めて薬剤代謝に関わる全てのアイソフォームを総合して検討し臨床と関連した更なる研究を行うことが必要である。

文献

- [1] Maruo Y, Takahashi H, Matsui K, Sato H, Takeuchi Y. Phase II drug metabolism and individualized drug therapy: a focus on functional genetic variation in UDP-glucuronosyltransferases. *Current Pharmacogenet Personal Med*, 8: 146-166, 2010.
- [2] Mimura Y, Maruo Y, Ohta Y, Sato H, Takeuchi Y. Effect of common exon Variant (p. P364L) on drug glucuronidation by the human UDP-glucuronosyl transferase 1 family. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*.

個の薬物療法を目指した臨床薬理学的アプローチ

寺田 智祐

滋賀医科大学医学部附属病院薬剤部

Clinical Pharmacological Approaches toward the Personalized Pharmacotherapy

Tomohiro TERADA

Department of Pharmacy, Shiga University of Medical Science Hospital

近年、がん領域を始めとする様々な疾患領域で、切れ味は鋭いが有害事象の発現頻度も大きい新薬が続々と上市されている。またその中には、ドラッグラグ解消のために早期に日本で承認され、日本人のデータが乏しい医薬品も少なくない。これら医薬品の有効性や安全性の担保は、主に製造販売後調査や特定使用成績調査に委ねられているのが現状であり、特にハイリスク医薬品については薬物間相互作用や遺伝子多型の影響を精査するなど、実地臨床におけるエビデンス作りが重要である。その実現のためには、「臨床薬理学」を基軸にした、基礎と臨床研究のシームレスな相互乗り入れによるハイリスク医薬品の個別化薬物療法の確立、並びに薬物血中濃度解析や遺伝子多型解析を日常診療の一環として実践できるオーダーメイド薬物療法実施の院内基盤整備が重要である。本研究では、腎がん治療薬として使用されている経口分子標的抗がん剤スニチニブと、ビッグアナイド系糖尿病治療薬であるメトホルミンの成果について紹介する。

昨年度の発表会において、薬物排出ポンプ BCRP (Breast Cancer Resistance Protein, ABCG2 で、多様な抗癌剤を輸送し、薬剤耐性に極めて重要と考えられる ABC トランスポーター) の機能低下を引き起こす遺伝子多型によって、スニチニブの血中濃度が著しく上昇することを報告した。そこで、Bcrp 遺伝子欠損動物を用いて、スニチニブ体内動態特性を精査した。その結果、スニチニブを経口投与した場合の濃度曲線下面積 AUC は、欠損型マウスで野生型マウスの約 4 倍大きかった。一方、静脈内投与では AUC (濃度曲線下面積) に差が認められなかった。従って、Bcrp の機能低下による血中濃度の上昇は、消化管における吸収促進が大きく関与していることが判明した。また、透析施行中の患者に、スニチニブが投与された症例を経験した。透析日と非透析日でスニチニブの体内動態パラメータを算

出したところ、両者に有意な差は認められなかった。さらに外来受診時に定期的に血中濃度を測定したところ、動物実験で示されている有効血中濃度範囲を安定して維持していることが分かった。スニチニブ治療を 2 サイクル行った後の画像評価では、肺転移巣が部分奏効 (PR) と評価された。このように、血中濃度測定を実施することによって、透析患者においてもスニチニブの治療を安全に施行できることが示された。

メトホルミンは腎排泄型の薬物であり、有機カチオントランスポーター群 (側底膜の膜電位依存性有機カチオントランスポータ、OCT (Organic Cation Transporter) と刷子縁膜の H⁺/有機カチオントランスポータ、MATE (Multidrug And Toxin Extrusion)) によって尿細管分泌が媒介されている。これまで OCT の遺伝子多型によってメトホルミンの血中濃度が影響を受けることが報告されていたが、MATE の影響については不明であった。そこで、48 名の糖尿病患者を対象にして、ファーマコゲノミクス解析を行った。その結果、MATE の遺伝子多型とメトホルミン経口クリアランスの間には、有意な相関は認められなかった。これは MATE の遺伝子多型をホモで有する患者は少なく、ほとんどがヘテロ患者であったことが原因として考えられた。そこで、Mate1 遺伝子欠損マウスを用いて薬物動態解析を行ったところ、欠損型では著しい血中濃度の上昇が認められたが、ヘテロ型と野生型マウスはほぼ同一の血中濃度プロファイルを示した。従って、メトホルミンの血中濃度の個体差には、MATE の遺伝子多型は大きく寄与しないことが推察された。

文献

- [1] Mizuno T, Terada T, Kamba T, Fukudo M, Katsura T, Nakamura E, Ogawa O, Inui K: ABCG2 421C>A polymorphism and high exposure of sunitinib in a patient with renal cell carcinoma. Ann. Oncol.,

21(6):1382-1383, 2010.

- [2] Toyama K, Yonezawa A, Tsuda M, Masuda S, Yano I, Terada T, Osawa R, Katsura T, Hosokawa M, Fujimoto S, Inagaki N, Inui K: Heterozygous variants of multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K) have little influence on the disposition of metformin in diabetic patients. *Pharmacogenetics*, 20(2):135-138, 2010.

シトクロムP450とUDP-グルクロン酸転移酵素発現系を用いた迅速な薬物代謝解析の臨床応用

生城 真一

富山県立大学 工学部 生物工学科 准教授
滋賀医科大学 生命科学講座 客員准教授

Application of a co-expression system of cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase to rapid analysis of drug metabolism

Shinichi IKUSHIRO

Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Toyama Prefectural University

はじめに

医薬品の薬効、副作用発現に対する遺伝的背景を把握して、薬物動態関連酵素における遺伝子多型に基づいたテーラーメイド医療の実現が期待されている。特に代謝に関わるシトクロムP450(P450)、UDP-グルクロン酸転移酵素(UGT)や吸収排泄に関わるトランスポーターなどが薬剤への応答性に重大な影響を持つと考えられているが、これら酵素群は協調して機能していることからヒトでの代謝様式を予測するためには総合的な理解が必要である。このような背景から、*in vitro*での薬効、副作用の予測可能な解析系の構築を目指し、酵母をはじめとした各種発現系を用いてヒト及び実験動物由来薬物代謝酵素遺伝子を発現させることによりさまざまな薬物の迅速な代謝解析を可能にしてきた[1]。特に複数の薬物代謝酵素を導入した遺伝子改変酵母による薬物代謝測定系は、新規医薬品の代謝様式解明や代謝物調製に有用であることが示されている[2]。本報告では、現在進行中である2つの共同研究(1.

活性亢進を示すUGT1A5の新規遺伝子多型の機能解析、2.痛風・高尿酸血漿治療薬の抱合代謝解析)について報告する。

活性亢進を示すUGT1A5の新規遺伝子多型の機能解析

ヒトUGT1A5はUGT1遺伝子ファミリーに属する分子種であり、UGT1遺伝子複合体より選択的スプライシングにより作り出される。ヒトにおいてはUGT1分子種は多くの薬物代謝に関与しており、その遺伝子多型は薬効、副作用発現に影響を及ぼすことが指摘されてきた。近年、UGT1A5は主に腸管に発現することが明らかにされたが、アミノ酸相同性の高いUGT1A3やUGT1A4が多くの薬物代謝に寄与しているのに対して、その機能については不明な点が多い。最近、丸尾らは日本人におけるUGT1A5の新規遺伝子多型を見いだした[3]。本多型はUGT1A5前半領域に複数のアミノ酸置換を伴う変異が生じており、本酵素の活性変動が予想された。動物細胞を用いた変異UGT1A5遺伝子の発現系を構築してその抱

合活性の評価を行ったところ、野生型と比較しておよそ数十倍の活性亢進を示し、UGT1A3と同程度の活性を有することが明らかとなった。これまでに知られているハプロタイプの遺伝子型をもつ分子種との比較より、4つのアミノ酸変異が活性亢進に寄与していることが推定された。また、UGTの立体構造予測より、これらアミノ酸残基は触媒ドメインのUDP-グルクロン酸結合に関与する領域に位置すると予想される。本新規遺伝子多型を有するUGT1A5は、その活性亢進よりUGT1A3やUGT1A4とともに薬物代謝に寄与している可能性が示唆された。

痛風・高尿酸血症治療薬の抱合代謝解析

近年開発されたフェブキソスタット (FXS) は、非プリン骨格の新規尿酸生成抑制剤であり、従来の治療薬よりも有効性、安全性、使用性の点で優れている。高尿酸血症は多くの生活習慣病との関連性が報告されており、今後FXSは生活習慣病治療薬との併用が大幅に増加すると予想される。本剤はグルクロン酸抱合が主代謝経路であるが、分子種の同定、薬物相互作用の有無、薬物動態に関する情報が乏しく、きめ細やかな薬物療法の確立のためにはこれらの情報収集が必須である。そこで、本研究ではFXSによる安全な痛風治療法の確立を目的として、グルクロン酸抱合代謝に焦点をしばって解析をおこなっている。ヒト肝臓ミクロソームにおけるFXS抱合代謝物を解析したところ、カルボキシル基がエステル型抱合をうけるアシル抱合の生成が見られた。ヒトUGT発現系を用いた代謝解析よりUGT1A1, 1A8及び1A9の複数の分子種により抱合化を受けることが示された。さらに肝臓ミクロソームにおけるUGTタンパク発現及び活性相関よりFXS抱合にはUGT1A1の寄与が大きいことが示唆された。さらにUGT1A1における遺伝子多型 (UGT1A1*6, 1A1*28) が及ぼすFXS代謝能の解析

をおこなう予定である。また、FXSのアシル抱合体はその特性よりグルクロン酸が分子内転位をおこなうなど不安定であり、複数の異性体に変換される。それゆえ血中代謝物測定に必要とされる標準品の合成が困難であるが、UGT発現酵母菌体を用いることにより安定にかつ簡便にアシル抱合体を合成することが可能であり、臨床現場での薬物濃度測定に有用な技術であると考えている [4, 5]。

今後、真の意味で基礎と臨床の融合を目指して、薬物代謝酵素発現系を用いたヒト薬物代謝過程の分子基盤の解明を通して、医薬品の適正使用のための情報支援や個体差を考慮したテーラーメイド医療の確立に貢献していきたい。

文献

- [1] Uchihashi, S., Fukumoto, H., Onoda, M., Hayakawa, H., Ikushiro, S., and Sakaki, T., Multiple isoform dependent glucuronidation of a selective c-Fos/activator protein-1 inhibitor T-5224. *Drug Metabolism and Disposition*, 39:803-813, 2011
- [2] 生城真一. バイオメディア「酵母でヒト代謝物をつくる」*生物工学誌*, 89:p342, 2011
- [3] 日置菜月、岩田有吾、丸尾良浩、佐藤浩、榊利之、生城真一. ヒトUGT1A5における遺伝子多型とその機能解析第84回日本生化学大会要旨集, p134, 2011
- [4] 増山優香、安田佳織、鎌倉昌樹、榊利之、生城真一. 酵母を用いたグルクロン酸抱合体調製システムの構築, *日本農芸化学会 2011 年度大会講演要旨集*, p222, 2010
- [5] Nishikawa, M., Masuyama, Y., Hasegawa, T., Kamakura, M., Sakaki, T., and Ikushiro, S., Whole cell-dependent production of acyl glucuronide using genetically engineered budding yeast. 第26回日本薬物動態学会年会講演要旨集, p250, 2011