

学位論文題名

薬物代謝に関する

新規ヒト小腸チトクローム P450の研究

－抗ヒスタミン薬エバスチンをプローブ薬として－

学位論文内容の要旨

はじめに

チトクローム P450 (P450) は、医薬品などの代謝に重要な役割を担っている酵素である。特に、肝臓には P450 が最も多く存在することから、肝臓が薬物代謝の主たる場と考えられてきた。しかしながら、近年、薬物代謝に小腸に存在する P450 が関与し、医薬品の体内動態に影響を与え、薬効の増強や減弱、副作用の発現などを引き起こす例が報告されてきた。ヒト小腸に存在する P450 のうち、臨床で薬物代謝への関与が報告されている分子種は CYP3A4 のみであり、体内動態における小腸 P450 の役割に関する知見は極めて少ない。

抗ヒスタミン薬エバスチンの代謝には、不活性代謝物を生成する脱アルキル化と薬理活性本体カレバスチンに至る代謝中間体を生成する水酸化の 2 経路が知られている。ラットに経口投与されたエバスチンは主に小腸で代謝されカレバスチンに変換されること、また、経口投与後の動物およびヒト血漿中にはエバスチンはほとんど認められず、主代謝物としてカレバスチンが存在することより、エバスチンは、動物種にかかわらず、主に小腸で代謝を受けるものと推察される。また、著者らはヒト肝ミクロゾームを用いた *in vitro* 実験で、CYP3A4 以外の未知 P450 がエバスチン水酸化に関与していることを証明した。したがって、エバスチンは小腸でも未知の P450 で代謝される可能性が高いと推察される。

本研究は、エバスチンをプローブ薬として、ヒト小腸において薬物代謝に関与する P450 を明らかにすることを目的とした。

1. ヒト小腸ミクロゾームによるエバスチンの代謝

エバスチンはヒト小腸ミクロゾームにより代謝され、脱アルキル化体および水酸化体が生成した。その代謝酵素を同定するため、ヒト P450 発現系による代謝、P450 阻害剤による阻害および抗 P450 抗体による阻害を調べた。12 種の P450 発現系 (CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 4A11) を用いてエバスチンの代謝を調べた結果、両活性は CYP3A4 のみに存在した。しかし、ヒト小腸ミクロゾームにおける脱アルキル化はケトコナゾールや抗 CYP3A 抗体により完全に阻害されたのに対し、水酸化は検討したすべての P450 阻害剤および抗 P450 抗体によって影響を受けなかった。したがって、エバスチンの水酸化は今回検討した以外の P450 により触媒されることが判明し、ヒト小腸ミクロゾームには薬物代謝に関与する未知の P450 が存在することが示唆された。

2. エバスチンの水酸化を触媒するサル小腸 P450 の精製

ヒト小腸においてエバスチンの水酸化に関わる酵素に関する情報を得るために、P450 のアミノ酸配列がヒ

トに最も近いサルの小腸からエバスチン水酸化を触媒する酵素を精製し、アミノ酸配列を調べた。その結果、2 種の P450 (P450MI-2, P450MI-3) が得られ、その活性は P450MI-2 が P450MI-3 に比べ顕著に高かった。アミノ酸配列を検索した結果、P450MI-2 は CYP4F, P450MI-3 は CYP3A に属することが判明した。さらに、サル小腸のエバスチン水酸化酵素活性は、抗 CYP4F 抗体により阻害された (約 70%) が、抗 CYP3A 抗体による阻害は認められなかった。したがって、CYP4F がサル小腸において主としてエバスチン水酸化を触媒する酵素であることが明らかとなり、CYP4F がはじめて薬物代謝に関与することが判明した。

3. ヒト小腸でのエバスチン水酸化における CYP4F の役割

CYP4F は肝臓や白血球に存在し、ロイコトリエン B₄ やアラキドン酸の ω -水酸化酵素として知られるが、ヒト小腸での存在や薬物代謝への寄与は不明である。そこで、ヒト小腸での CYP4F の存在を調べ、次にヒト小腸でのエバスチン水酸化における CYP4F の寄与を検討した。サル P450MI-2 と最もアミノ酸配列の相同性が高いヒト CYP4F2 の遺伝子配列を基にプライマーを作製し、ヒト小腸 cDNA ライブラリーから PCR を行ったら、CYP4F2 とともに新規 CYP4F (CYP4F12) の存在が明らかとなった。それぞれを酵母内に発現させ、エバスチン水酸化酵素活性を測定した結果、CYP4F12 がエバスチン水酸化を触媒することが判明した。一方、CYP4F2 にはほとんど活性は認められなかった。また、抗 CYP4F 抗体および 17-ODYA によりヒト小腸マイクロゾームによるエバスチン水酸化は阻害された。しかし、その阻害の程度はともに小さく (約 20%)、ヒトとサルでエバスチン水酸化における CYP4F の寄与に種差が認められた。したがって、ヒト小腸におけるエバスチン水酸化には、別の代謝酵素が主に関与していることが示唆された。

4. ヒト小腸においてエバスチンの水酸化に関与する主代謝酵素の同定

ロイコトリエン B₄ やアラキドン酸は、CYP4F 以外の P450 の基質にもなる。そこで、それらのヒト小腸マイクロゾームによるエバスチン水酸化に及ぼす影響を調べた結果、水酸化はアラキドン酸によってのみ強く阻害された。そこでこれまでに検討した P450 以外で、小腸に存在し、アラキドン酸代謝に関与する CYP2J2 に着目した。CYP2J2 を酵母内に発現させ、エバスチン水酸化酵素活性を測定したところ、極めて高い活性が認められた。さらに抗 CYP2J 抗体は、ヒト小腸マイクロゾームのエバスチン水酸化酵素活性を強く阻害した (約 70%)。したがって、CYP2J2 はヒト小腸マイクロゾームにおけるエバスチン水酸化の主代謝酵素と考えられ、CYP2J が薬物代謝に関与することをはじめて見出した。

以上、ヒト小腸で薬物代謝に関与する重要な酵素として CYP2J および CYP4F を見出した。本研究で得られた知見は、ヒト小腸において CYP3A4 以外の P450 が薬物代謝に深く関与することを示唆する結果であり、ヒト小腸の薬物代謝研究のみならず、相互作用などの薬物動態研究の発展にも貢献するものと考えられる。

まとめ

抗ヒスタミン薬エバスチンをプローブ薬として、ヒト小腸において薬物代謝に関与する P450 について検討し、以下の知見を得た。

1. エバスチンはヒト小腸マイクロゾームにより脱アルキル化と水酸化の 2 経路で代謝され、脱アルキル化は、CYP3A4 により触媒されることが明らかとなった。
2. サル小腸においてエバスチンの水酸化を触媒する主代謝酵素は、CYP4F であることが半明し (寄与率約 70%)、はじめて CYP4F の薬物代謝への関与が明らかとなった。
3. ヒト小腸にも新規 CYP4F (CYP4F12) が存在し、薬物代謝酵素として、エバスチンの水酸化を触媒することがはじめて明らかとなった (約 20%)。また、その寄与はサル CYP4F に比べて小さく、ヒトとサルで種差が存在した。
4. さらに、ヒト小腸において主としてエバスチン水酸化を触媒する代謝酵素について検討した結果、小腸

に存在し、アラキドン酸代謝に関与する CYP2J2 が主代謝酵素であることが判明し (約 70%), CYP2J が薬物代謝に関与することがはじめて明らかとなった。

以上、ヒト小腸で薬物代謝に関与する重要な酵素として、CYP2J および CYP4F を見出した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鎌 滝 哲 也
副 査 教 授 原 島 秀 吉
副 査 助 教 授 紙 谷 浩 之
副 査 助 教 授 山 崎 浩 史

学 位 論 文 題 名

薬物代謝に関与する

新規ヒト小腸チトクローム P450の研究

－抗ヒスタミン薬エバスチンをプローブ薬として－

近年、ヒト小腸に存在するチトクローム P450 (P450) が薬物代謝に関与し、医薬品などの体内動態を変化させ、薬効や副作用の発現に影響を与えることが明らかとなってきた。しかしながら、臨床で薬物代謝への関与が報告されている小腸 P450 は CYP3A4 のみであり、小腸 P450 に関する知見は極めて少ない。本研究では、抗ヒスタミン薬エバスチンをプローブ薬として、ヒト小腸において薬物代謝に関与する新規の P450 を発見した。本研究はヒト小腸の薬物代謝、ひいてはヒトにおける薬効や副作用の予測に関して有用な概念を提供するものであり、以下に詳述するように極めて優れた研究成果であると評価される。

(1) ヒト小腸ミクロゾームによるエバスチンの代謝

エバスチンがヒト小腸ミクロゾームによって代謝されるか否かを調べ、さらにその代謝酵素について検討した。その結果、エバスチンはヒト小腸ミクロゾームにより脱アルキル化と水酸化を受け、前者は CYP3A4 により触媒されるが、後者は薬物代謝に関与する P450 (CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 4A11) とは別の P450 により触媒されることが明らかとなった。したがって、ヒト小腸に、エバスチンの水酸化を触媒する未知の P450 が存在することが示唆された。

(2) エバスチンの水酸化を触媒するサル小腸 P450 の精製

ヒト小腸においてエバスチンの水酸化に関わる酵素に関する情報を得るために、P450 のアミノ

酸配列がヒトに最も近いサルを用いて、その小腸からエバスチン水酸化を触媒する酵素を精製し、アミノ酸配列を調べた。その結果、2種の P450 (P450MI-2, P450MI-3) が得られ、その触媒活性は P450MI-2 が P450MI-3 に比べ顕著に高かった。アミノ酸配列の解析結果より、P450MI-2 は CYP4F、P450MI-3 は CYP3A に属することが判明した。さらに、サル小腸のエバスチン水酸化酵素活性は、抗 CYP4F 抗体により約 70% 阻害されたが、抗 CYP3A 抗体による阻害は認められなかった。したがって、CYP4F がサル小腸において主としてエバスチン水酸化を触媒する酵素であることが明らかとなり、CYP4F がはじめて薬物代謝に関与することが判明した。

(3) ヒト小腸でのエバスチン水酸化における CYP4F の役割

CYP4F は肝臓や白血球に存在し、ロイコトリエン B₄ やアラキドン酸の ω -水酸化酵素として知られるが、ヒト小腸での存在や薬物代謝への関与は不明であった。そこで、ヒト小腸 cDNA ライブラリーから CYP4F 遺伝子を検索し、小腸での存在の有無を調べたところ、CYP4F2 および新規の CYP4F 遺伝子 (CYP4F12) を見つけた。酵母内に発現させ、エバスチン水酸化酵素活性を測定した結果、CYP4F12 のみに明らかな触媒活性が認められた。また、ヒト小腸マイクロゾームによるエバスチン水酸化は抗 CYP4F 抗体および 17-ODYA により阻害された。しかし、その阻害の程度はともに小さく (約 20%)、ヒトとサルでエバスチン水酸化における CYP4F の寄与に種差が認められた。したがって、ヒト小腸におけるエバスチン水酸化には、主として CYP4F 以外の酵素が関与していることが示唆された。

(4) ヒト小腸においてエバスチンの水酸化に関与する主代謝酵素の同定

ロイコトリエン B₄ やアラキドン酸は、CYP4F 以外の P450 の基質にもなる。それらのヒト小腸マイクロゾームによるエバスチン水酸化におよぼす影響を調べた結果、水酸化はアラキドン酸によってのみ強く阻害された。そこでこれまでに検討した P450 以外で、小腸に存在し、アラキドン酸代謝に関与する CYP2J2 に着目した。CYP2J2 を酵母内に発現させ、エバスチン水酸化酵素活性を測定したところ、極めて高い活性が認められた。さらに抗 CYP2J 抗体は、ヒト小腸マイクロゾームのエバスチン水酸化酵素活性を強く阻害した (約 70%)。したがって、CYP2J2 はヒト小腸マイクロゾームにおけるエバスチン水酸化の主代謝酵素と考えられ、CYP2J が薬物代謝に関与することをはじめて見出した。

以上、ヒト小腸で薬物代謝に関与する重要な酵素として CYP2J および CYP4F を発見した。本研究で得られた知見は、ヒト小腸において CYP3A4 以外の P450 が薬物代謝に関与することを示唆する結果であり、ヒト小腸の薬物代謝に関して新しい重要な概念を提案した。本論文『薬物代謝に関与する新規ヒト小腸チトクローム P450 の研究 —抗ヒスタミン薬エバスチンをプローブ薬として—』に含まれる研究成果は薬学における基礎および応用のいずれにおいても優れており、博士(薬学)の学位を受けるに充分値するものと認めた。