

脂肪族あるいは芳香族アルデヒド、ならびに脂肪族あるいは脂環式ケトンの還元を行う。その活性はピラゾールで阻害される。また、ジヒドロジオールデヒドロゲナーゼ (AKRIC1, AKRIC2, AKRIC4) は、プロスタグランジン類、チロキソン、ナルトレキソン、ベソノロールおよびアセトヘキサミドなどのカルボニル基を還元する。

一方、カルボニルレダクターゼ (以前はケトンレダクターゼとよばれていた) とよばれる還元酵素が可溶性画分に存在する。本酵素は NADPH を補酵素とするが、基質特異性と阻害剤の違いなどにより、アルデヒドレダクターゼと区別されている。アルデヒドレダクターゼは、種々のアルデヒドならびに一部のケトンをアルコールに還元し、バルビツール酸誘導体で特異的に阻害される。

カルボニルレダクターゼはアルデヒド、ケトンを還元し、植物フラボノイドのクエルセチンあるいはクエルシトリンで強く阻害される。活性は、特に肝および腎で最も高く、心、肺、脳、小腸、脾、筋肉、赤血球など多くの臓器組織でも見られる。

### 3.4 薬物の加水分解反応に関与する酵素系

生体内で加水分解を受ける化合物の構造は、エステル、チオエステル、ヒドラジド、アミド、カルバミン酸エステル、エポキシド、 $\beta$ -ラクタム、ペプチドなど多岐にわたっており、これらの化合物の加水分解を触媒する酵素は、薬物の代謝的活性化や解毒過程において重要な役割を果たしている。加水分解反応による薬効や毒性の変化に関しては、82・4で詳細に記載したので、本節ではエステルやアミド型プロドラッグの代謝酵素として主要な役割を果たしているエステラーゼと P450 の酸化代謝により生成したエポキシドを加水分解するエポキシドヒドロラーゼについて解説する。

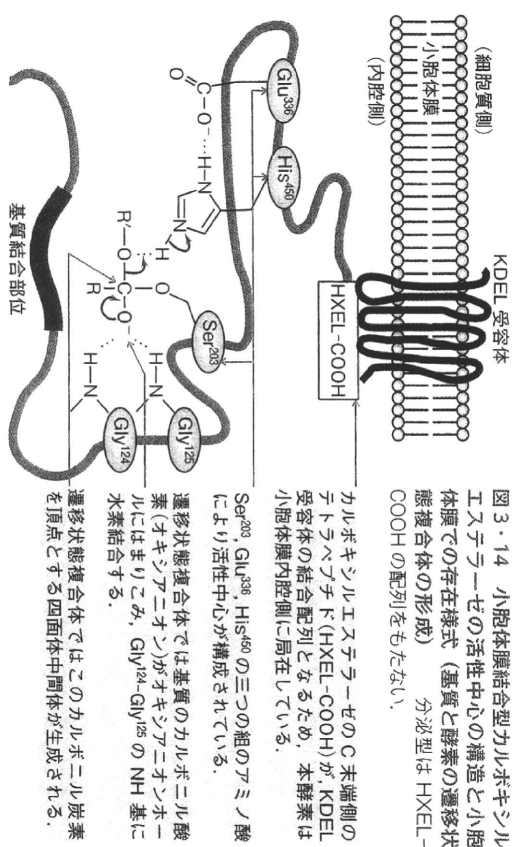
#### 3.4.1 エステラーゼ

薬物代謝に関与するエステラーゼの中で、カルボキシルエステラーゼ (carboxylesterase, CES) は、82・4や810・5に示したようなエステルやアミド型プロドラッグの代謝や薬物の加水分解にかかわる代表的な酵素である。CES は、肝を始めとして小腸、血漿、筋肉、腎、肺、脳など臓器に発現している。これらの中で、代表的な基質に対する活性は肝において最も高く認められる。しかし、小腸や肺、血漿においても比較的高い活性が認められ、CES 分子種間の基質特異性や酵素比活性の差異がエステルやアミド型プロドラッグの体内動態に大きな影響を与える。また、実験動物およびヒト間で大きな種差が存在し、ラット、マウス血漿中に存在する CES の相同分子種がヒトでは存在しないことや、ビーグル犬では小腸におい

て CES の発現が非常に低いことがわかっている。CES は、カルボキシルエステルに限らず、アミド結合やチオエステル結合の加水分解反応も触媒する。一般的にプロドラッグを設計する場合、親化合物の修飾部位として、水酸基(-OH)、カルボキシ基(-COOH)、アミノ基(-NH<sub>2</sub>)、チオール基(-SH) を考え、これらの基にエステル結合、アミド結合、チオエステル結合を導入する場合が多い。そのため、生体内の CES により代謝される数多くのプロドラッグが知られている。吸収改善を目的としたプロドラッグとして、アスコナテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬のカルボン酸をエステルにしたテモカプリル、エナラプリルや、抗炎症薬のインドメタシン、フロアルネシルなどがある。さらに、現在抗がん薬として用いられているイリノテカンも CES により代謝される (p. 92, 93 参照)。

本酵素の加水分解反応は、酵素のセリン残基と基質のアシル基がアシル-酵素中間体を形成し、最初の生成物 (R'-OH, R'-NH<sub>2</sub>, R'-SH) が離れた後、第二の基質である H<sub>2</sub>O にアシル基を転移することにより終了する。したがって、エタノールなどの求核試薬が多量に存在すると、アシル基を H<sub>2</sub>O の代わりにエタノールに転移する。実際に、ヒトがココカインとアルコールを併用すると CES が関与しココカインからココエチレンが生成し、このココエチレンが脳内に長くとどまるためにココカインの作用が持続するとされている。

CES はトリアシルグリセロールの加水分解酵素を含む酵素群で、薬物代謝には



リペプチドで、非タンパク質性-SH成分として細胞内に多量に存在する。グルタチオンの細胞内濃度は、臓器によって異なるが一般に0.5~10 mMの範囲にあるとされ、通常は還元型が大部分を占める。グルタチオンの生体内における役割およびその関連酵素を表9・2に示す。グルタチオンは、細胞機能を維持するうえで極めて重要な役割を果たしていることがわかる。また、グルタチオンは活性代謝物の解毒に大きな役割を果たしており、空腹時には低下する(日差)。無理なダイエツトをするとその濃度低下により、肝での解毒能が著しく低下する。したがって、細胞内のグルタチオン濃度が低下すると、アセトアミノフェンなど多くの薬毒物の毒性が容易に発現し、またその程度も強く現れる。

表9・2 グルタチオンおよびグルタチオン依存性解毒系の役割†

グルタチオンの役割	グルタチオン関連酵素	基質
・ラジカルの捕捉 ・酸化還元による細胞機能の調節 ・各種酵素のSH供与体	グルタチオントランスフェラーゼ(細胞質)	各種薬毒物 芳香族ニトロおよびハロゲン化合物 アルキルハロゲン化合物 アルケニル芳香族炭化水素 アレーンおよびアルケンエポキシド 脂質ヒドロペルオキシド 上記基質の一部
	グルタチオントランスフェラーゼ(小胞体)	脂質ヒドロペルオキシド リン脂質ヒドロペルオキシド 過酸化水素
	Se含有グルタチオンペルオキシダーゼ	過酸化水素 脂質ヒドロペルオキシド

† グルタチオンは、細胞内に多量に存在するトリペプチドで、それ自身が抗酸化作用を有し、細胞内の酸化還元状態の維持に役立っている。また、各種酵素の作用により、酸化的物質の消去に関与し、薬毒物の抱合反応に利用され解毒作用を示す。細胞内のグルタチオン含量の減少は、薬毒物による障害を受けやすくする。

## 9・4 薬物アレルギー

### 9・4・1 薬物アレルギーの特徴

薬物アレルギーとは、薬物の投与によって誘発される薬物または代謝物を抗原とした過敏反応をいう。医薬品の副作用として発生頻度が高く、特定の医薬品において一部の人に発症し、その原因や機序は多様であり、さまざまな症状が現れ、ときに重篤な毒性を示すことがある。薬物アレルギー(過敏症)は、1) 実験動物で再現できない、2) 治療用量でも起こる、3) 用量相関性が少ない、4) 医薬品の構造や薬理作用と相関しない、という特徴があり、医薬品開発において問題となる場合が少なくない。

### 9・4・2 薬物アレルギーの分類

薬物アレルギーの症状は多形であり、症状の80%以上は皮膚に薬疹などとして発現する。全身反応の発現頻度は低いが生命の危険を伴う重篤症状を呈する場合もある。アレルギー反応はCoombsとGellによる古典的な4型に分類される(表9・3)。医薬品によるアレルギー反応も同様に分類されるが、アレルギー反応はリソソームを中心とした複雑なサイトカインのネットワークによって制御されており、一つの型によらない混合型の反応が多く、明確な分類は難しい。

I~III型の反応は体液性免疫反応であり、ハブゲンとなる化学物質に対するIgE産生はおもにI型を、IgGやIgMは細胞傷害型のII型および、免疫複合体形成反応を特徴とするIII型の反応を起こす。II型は医薬品によって細胞表面に形成された抗原に対して抗体が結合し、補体が活性化されることが原因となり、III型は形成された免疫複合体が標的組織で障害性を示す反応である。IV型は感作T細胞を介する細胞性免疫反応であり、薬物投与から発症まで時間がかかる遅延型である。I型には、メブアエーター(化学伝達物質)によるアナフィラキシーショックを起こす即時型反応も含まれる。

表9・3 薬物アレルギーの分類とおもな皮膚症状と全身症状

反応	I型 アナフィラキシー型	II型 細胞傷害型	III型 免疫複合体型	IV型 遅延型、細胞性免疫型
抗体抗原	IgE	IgG, M	IgG, M	T細胞
抗原	外来性抗原	細胞膜、基底膜	外来性抗原、自己抗原	外来性抗原、細胞表面抗原
メブアエーター	ヒスタミン、サイトカイン	補体	補体	サイトカイン
皮膚疾患	じんま疹	薬疹	紫斑病(過敏性血管炎)、全身性紅斑性狼瘡	接触性皮膚炎、播種性紅斑
全身疾患など	アレルギー性気管支喘息、アナフィラキシーショック	溶血性貧血、顆粒球減少症、血小板減少症	肝障害、腎障害、溶血性貧血	肝障害、接触性皮膚炎、光過敏症

### 9・4・3 薬物アレルギーの誘発機序

生体内で抗原性を示すものは、一般に分子量数千以上の高分子であり、酵素製剤や抗体医薬品など一部の医薬品を除いて、ほとんどの医薬品は分子量1000以下の低分子化合物であるために、それ自身には免疫原性もアレルギー原性(両者をお

わけて抗原性という) もない。薬物アレルギーには以下のような特徴がある: 1) 薬物または活性代謝物 (特に反応性中間体) が共有結合して抗原となる高分子の生体成分 (キャリアー (carrier)) が介在し細胞傷害性を示すが、キャリアーが特定されている場合はきわめて少ない; 2) 生体高分子と結合する薬物または反応性中間体がハブテンとなつて、過剰な免疫応答を起こすと考えられているが、反応性中間体の構造解明は困難である場合が多い; 3) ヘルパー T 細胞である Th1 細胞と Th2 細胞の相互調節機能のバランスが崩れることが原因の一つと考えられている; 4) ヒトにおける薬物アレルギー過敏症を予測できる実験動物が確立されていない。

薬物によるアレルギー反応の誘発は、1) 抗原感作による反応と、2) ハブテンまたは非特異的免疫複合体形成による反応に分類される。前者は、異種タンパク質やペプチド性製剤の大量投与の場合に起こる III 型アレルギー反応である。遺伝子組換えによって製造されたヒトタンパク質製剤は同種タンパク質であるが、細菌由来の糖鎖などが微量に混在することが原因となることが知られている。後者については、ベンジルペニシリンなどのβ-ラクタム系抗菌薬が、キャリアーと共有結合しハブテンとして働き、I や II 型の反応を生じることが知られている。しかしほとんどの場合には、代謝反応によって生成された反応性中間体がハブテンとなり、キャリアーである生体成分と結合して抗原性を発現し、過剰な免疫反応を誘発することが原因である。

#### 9.4.4 薬物アレルギーの症状と原因薬物

薬物アレルギーを症状から分類することは難しく、原因薬物を確定するためには抗体検査などが必要である。(表9.4)

- 1) アナフィラキシー: 最も重篤な反応であり、遊離したケミカルメダイエーターにより全身症状を起こす。末梢組織への血流量が減少し、臓器や組織の生理機能が障害されることにより死亡することもある。
- 2) 皮膚障害 (皮膚過敏症): I 型によるじんま疹、II 型による細胞傷害型薬疹、III 型による全身性紅斑性狼瘡 (エリテマトーデス) (systemic lupus erythematosus, SLE), IV 型による接触性皮膚炎や光過敏性皮膚炎がよく知られている。

固定薬疹は薬疹の中では頻度が高く、“ピリン疹 (アミノピリンやアソチピリンなどピラゾロン系薬物による薬疹の総称)” がよく知られている。同一部位に円形の紅斑を生じる。汎発性薬疹は全身性に見られる場合が多く、接触性麻疹 (じんま疹)、播種性紅斑、多形紅斑や光過敏性皮膚炎などがある。多形紅斑の重症型はスティーブンス・ジョンソン症候群 (Stevens-Johnson syn-

表9.4 薬物アレルギーの症状と原因薬物

障害の分類	原因薬
アナフィラキシーショック	ペニシリン, ストレプトマイシン, 酵素製剤
肝障害	ハロタン, トログリタゾン, フルタミド
腎障害	サルファ剤, プロブフェン, リンゴシリン
顆粒球減少症	スルホンアミド系抗菌薬, ピラゾロン系薬物, バンコマイシン
血小板減少症	α-メチルドパ, イソブタミジン, クロルブプロピオン
溶血性貧血	α-メチルドパ, キニジン, カプトプリル, サルファ剤
呼吸器障害	ペニシリン, アセチルサリチル酸, パラアミノサリチル酸
SLE	プロカイソアミド, ヒドララジン, ヒダントイン系薬物
接触性皮膚炎	ペニシリン, スルホンアミド系抗菌薬
播種性紅斑	バルビツール酸, ペニシリン, スルホンアミド系抗菌薬
スティーブンス・ジョンソン症候群	NSAIDs, カルバマゼピン, ヒダントイン
中毒性表皮壊死症	スルフアメトキサゾール, オキシフェンブタゾン, ピロキシカム
光過敏症	ニューキノロン系抗菌薬, ケトプロフェン, グリセオフルビド

drome) とよばれ、病変が皮膚粘膜移行部に頻発し、重症型は全身の各臓器不全により死亡率が約 10% である。また、薬物による **中毒性表皮壊死症 (toxic epidermal necrosis, TEN)** は、重篤な経過をとり、広範な紅斑の後、表皮の壊死、呼吸困難、血便などが発症する。

- 3) 肝障害: II または IV 型による肝炎型と、IV 型による胆汁うっ滞型がある。発熱、食欲不振、嘔気を伴い、胆汁うっ滞型では黄疸が出る。投与された薬物またはその代謝物 (特に反応性中間体) が肝臓中のタンパク質と共有結合して抗原性をもつ場合が多い。
- 4) 腎障害: 肝臓と同様に薬によって障害を受けやすい臓器であり、II 型反応による糸球体障害と尿管障害がある。糸球体障害は、免疫複合体の沈着によると考えられている。尿管障害は尿管基底膜成分が薬物と結合し構造変化を受け、抗原性をもつことによる。

- 5) 血液・造血障害: 血液幹細胞の障害によって、顆粒球減少症、汎血球減少症、溶血性貧血や血小板減少症などが発症する。
- 6) 呼吸器症状: 気管支喘息は I 型の反応であり、薬物抗原に対応した IgE が肥満細胞を介してメチルエーターを放出させる。代表的な症状は **PLE (pulmonary infiltration with eosinophilia, 好酸球性肺浸潤)** 症候群である。

#### 9.4.5 抗原性薬物の代謝的活性化

- a. ペニシリン ペンジルペニシリン (benzylpenicillin, ペニシリン G, PCG)

アレルギーで最も多く見いだされる抗体はベンジルペニシロイル(BPO)基に対する抗体である(図9・3)。この抗体は、溶血性貧血、薬物熱などに関与する。しかし、アナフィラキシー反応に関与するのは、ベンジルペニシロイン酸、ベンジルペニロン酸などのマイナー抗原決定基(minor antigenic determinant)とよばれるBPOとは異なった抗原構造の抗体である。マイナー抗原決定基が生成される過程は不明であるが、PCGの代謝過程で生成したベンジルペニシロイン酸は強力なアシル化剤で、生成したベンジルペニシロイン酸に結合して二量体が、さらにPCG重合体が生成する。同様の機序でベンジルペニシロイン酸が生体高分子に結合する可能性。また、重合体が抗原となる可能性もある。抗原に関しては上記のように不明な部分もあるが、BPO基に対する抗体が生成することが証明されている。これは低分子薬物が生体高分子と結合して抗原として認識されることをはじめて示したことに重要な意義がある。

- b. ピラゾロン系解熱鎮痛薬
- i) アミノピリン 以前は常用されていたアミノピリンは、アレルギー様症

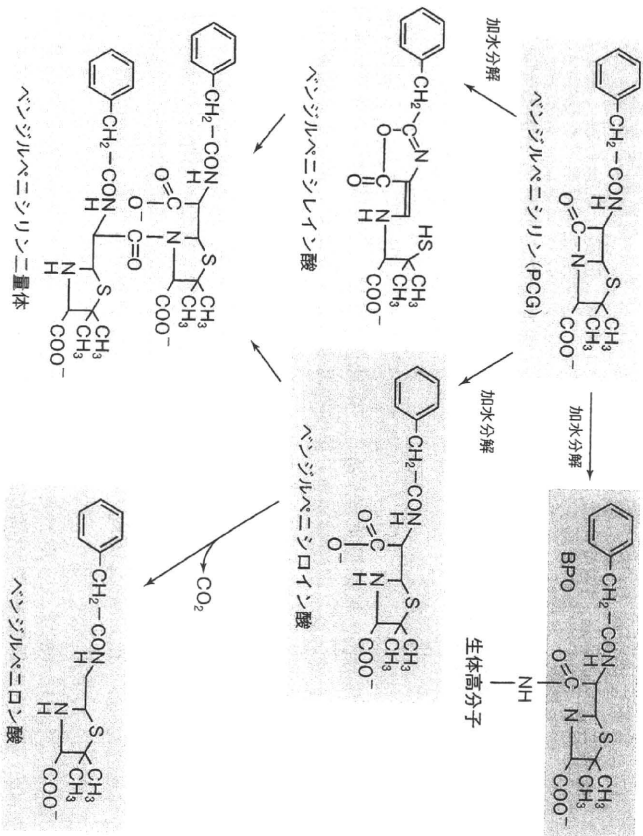


図9・3 ベンジルペニシリンの抗原化

状態起の頻度が高く、アナフィラキシーショック、じんま疹、固定薬疹、紅斑性狼瘡、顆粒球減少症などを起こす。主代謝経路(図9・4)は4位の脱メチルからモノメチル体を経て4-アミノアミンピリンとなり、さらに解毒的代謝反応を受けた不安定なAMPP(4-amino-5-methyl-2-phenyl-1H-pyrazol-3(2H)-one)となり重合してルバゾン酸やメチルルバゾン酸が生成する。AMPPはグルタチオンや他のラジカルスカベンジャーとも結合する。AMPPはモルモットの皮膚反応で紅斑が生成し、抗原性が認められている。また、別の代謝経路である5位のメチル基の酸化反応で生成する5-アルデヒド体にも抗原性が認められている。

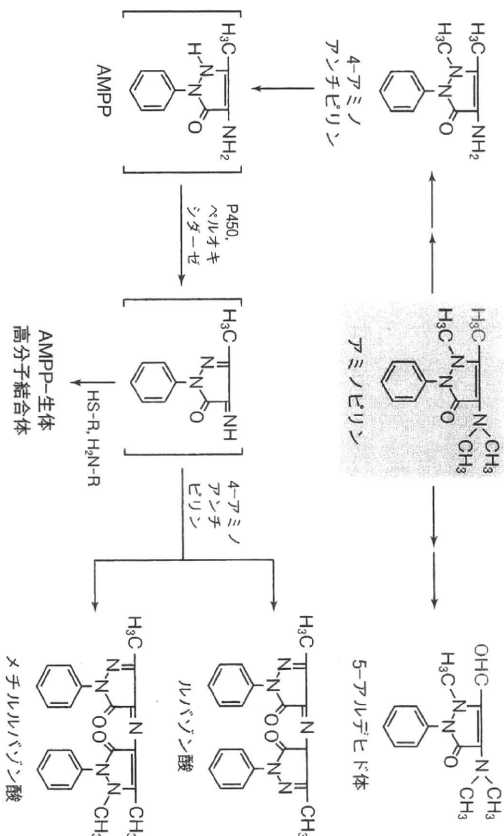


図9・4 アミノピリンの代謝的活性化

ii) アミンピリン アミンピリンの代謝(図9・5)は詳細に調べられているが、代謝物の中でホルアミンピリン-3-O-グルタチオン酸抱合体および硫酸抱合体が排泄されることが知られている。これはアミンピリンがN-脱メチル後、水素が分子内転位して生成した水酸基が抱合されたものである。中間体としてホルアミンピリンが生成するが、この化合物の4位の水素は不安定で酸化反応で容易に脱離するのでラジカルを形成し、グルタチオンと結合し、また、抗原性もある。一方、5位のメチル基の酸化反応で生成する5-アルデヒド体にもタンパク質結合性がある。

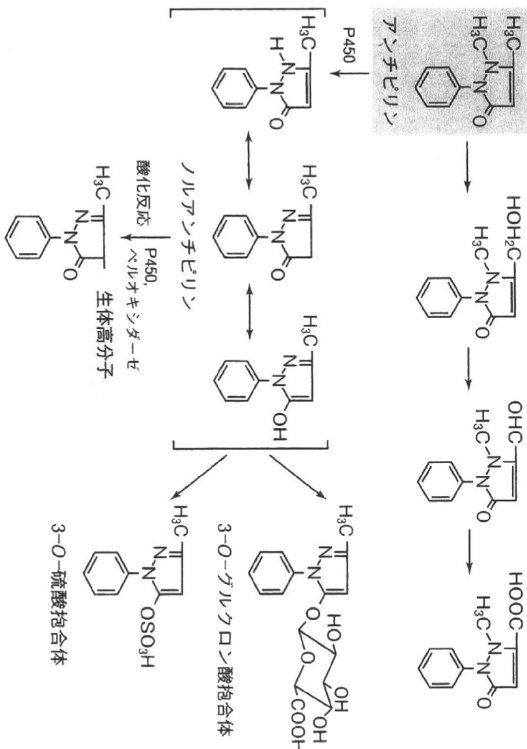


図 9.5 プロチペリンの代謝的活性化

c. ヒドアラジン ヒドアラジンは降圧薬として使用されているが、紅斑性狼瘡が生じることが知られている。ヒドアラジンはアセチル化で主として代謝されるので、アセチル化の遅いヒト (slow acetylator, SA) に紅斑は多く発症する。アセ

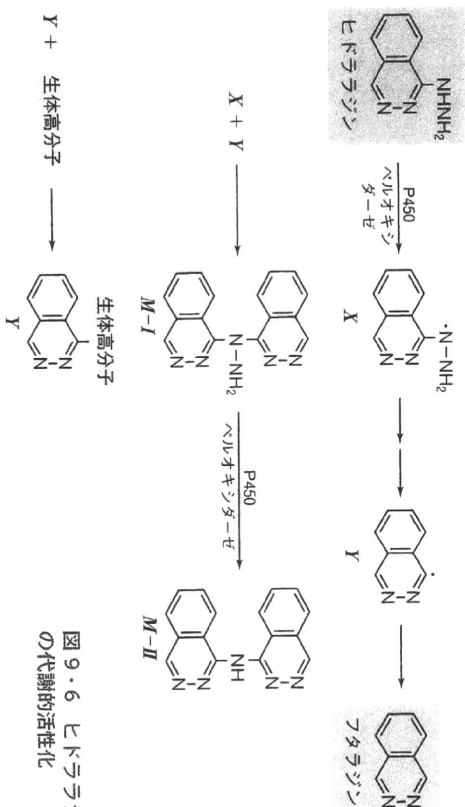


図 9.6 ヒドアラジンの代謝的活性化

チル化能が弱ければ、他の代謝反応能で補足される。ヒドアラジンは肝ミクロソームやペルオキシターゼによる酸化反応で図 9.6 に示すような二量体 (M-I, M-II) が生成する。そのとき、グルタチオンやε-アミノ基が存在するとプロチペリン (Y) との結合体が生成する。紅斑性狼瘡の患者から抗核抗体が検出されているので、このラジカルが核酸や核内タンパク質に結合して抗原化すると考えられている (図の下段)。

d. ハロタン ハロタンは優れた麻酔薬として繁用されたが、その吸入による肝障害がしばしば報告され、しかも劇症肝炎を誘発し死亡することから、現在は一次選択薬としての地位を失っている。ハロタンは図 9.7 に示すように、P450 により好氣的条件下でトリフルオロアセチルハライドを生じ、肝ミクロソームタンパク質と共有結合物を形成する。ハロタンの酸化的代謝経路で生成するトリフルオロアセチル基は、ヒト、ラット、ウサギの肝ミクロソームに存在するタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (protein disulfide-isomerase)、ホスホリパーゼ C (phospholipase C, PLC、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C)、カルジウム結合タンパク質の calregulin、カルボキシルエステラーゼ (carboxylesterase)、グルコース調節タンパク質 (glucose-regulated protein, GRP) と共有結合する。また、すべての患者が同様ではないが、劇症肝炎患者血清はこれらの高分子を抗原として認識する。これらのことからハロタン由来の抗原が患者血清中の特異抗体や特異 T 細胞による免疫侵襲の標的となり肝細胞障害に関与することがわかった。ハロタン肝障害に関する実験的ならびに臨床的研究は、その他の薬物による過敏性臓器障害の機構解明にも重要な示唆を与えている。

e. スルファミトキサゾール (スルホンアミド) スルホンアミド類による死亡例はまれであるが、重篤な副作用、スティーヴンス・ジョンソン症候群 (Stevens-

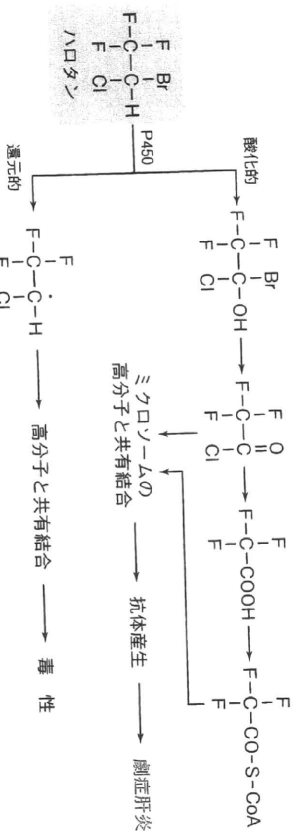


図 9.7 ハロタンの代謝的活性化

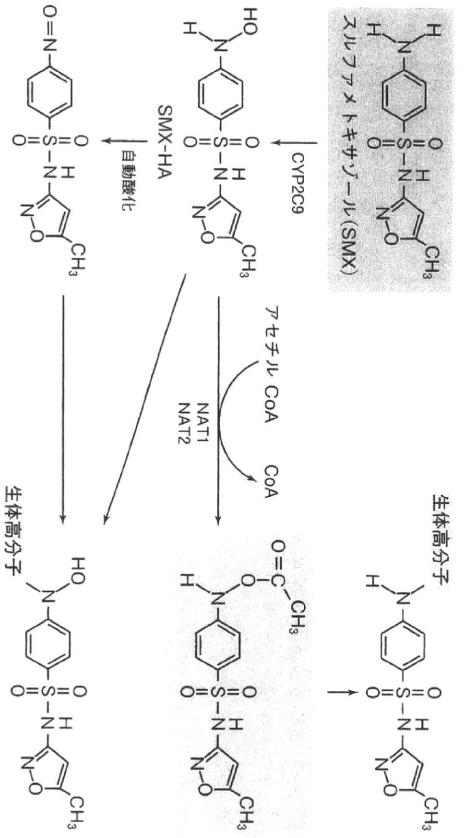


図9・8 スルファメトキサゾールの代謝的活性化 NAT: アセチルトランスフェラーゼ

Johnson syndrome), 中毒性表皮壊死症, 劇症肝炎, 悪性貧血などが起こる。皮膚の発赤などの副作用の兆候が現れたら投与を中止すべきである。

代表的なスルホンアミド化合物である抗菌薬 スルファメトキサゾール (sulfamethoxazole, SMX) の活性代謝物は、*N*-ヒドロキシ体 (SMX-HA), ニトロソ体のほか、最も反応性に富んだ *N*-アセトキシスルファメトキサゾール (*N*-acetylsulfamethoxazole) が検出されている (図9・8)。遅延型スルホンアミド過敏症 (発熱、関節炎、血液障害、肝障害) 患者の血液から、肝ミクロソームに存在するジスル

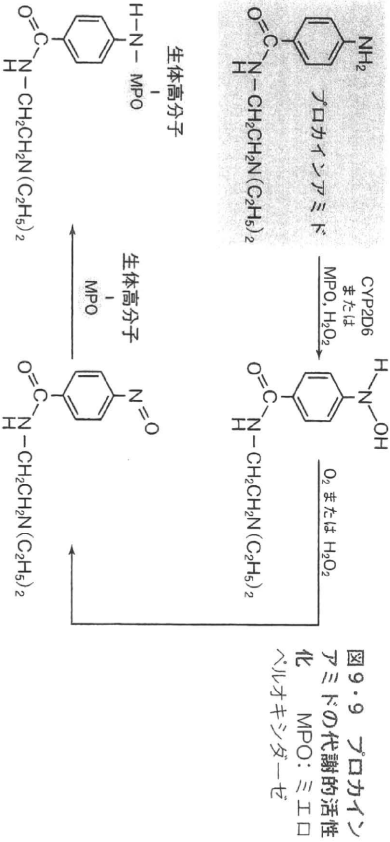


図9・9 プロロカインアミドの代謝的活性化 MPO: ミエロペルオキシダーゼ

フアイノキサマラーゼ (55 kDa), グルコース調節タンパク質 (80 kDa) および 96 kDa のタンパク質と付加体をつくることが知られている。

f. **プロロカインアミド** (図9・9) プロロカインアミドは局所麻酔薬として使用されているが、全身性紅斑性狼瘡のほか、溶血性貧血、好中球減少症、血小板減少症などの血液の症状が発現する。プロロカインアミドは肝臓では CYP2D6 によって、白血球では ミエロペルオキシダーゼ (MPO) によって *N*-水酸化され、さらに、酸化されてニトロソ体が生成する。そしてミエロペルオキシダーゼ、生体高分子と結合して抗原となる。

g. **イソオイゲノール** (図9・10) イソオイゲノールはイランイラン油中に含まれ、香水、果実香料、チューインガム、セッケンの香料として用いられているが、アレルギー性接触皮膚炎を起こすことが知られている。イソオイゲノールは  $\alpha, \beta$ -不飽和結合があるので P450、ペルオキシダーゼにより容易に活性化され、立体異性体の2種の二量体が生成する。このとき、グルタチオンあるいは、ヒスチジン、メチオニン、システイン、チロシン、リシンなどの求核的アミノ酸が存在すれば、これらと結合する。よって、皮膚のペルオキシダーゼにより活性化され、生体

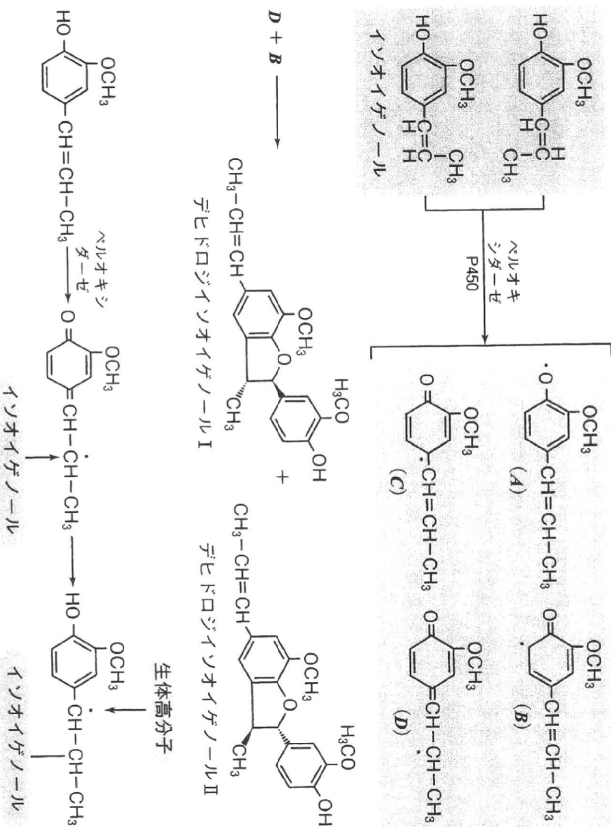


図9・10 イソオイゲノールの代謝的活性化

高分子と結合し抗原化し、接触性皮膚炎を惹起すると考えられている。

### 9.5 薬物代謝と臓器障害

薬毒物による生体障害はさまざまな要因により変動する。薬毒物による全身性の毒性の中では、毒作用の標的臓器として中枢神経系の占める頻度が高く、医薬品の副作用発現臓器として認められる場合も少なくない。ついで、血液と造血系から成る循環器系、肝、腎、肺、皮膚などでの出現頻度が高い。一般に筋肉や骨は、標的臓器として毒性が現れるケースは低いが、フイアラート系高脂血症用薬やシンバスタチンなどスタチン系の高コレステロール血症治療薬による横紋筋融解症が副作用として発症することもある。

以下、各種臓器について、薬毒物の代謝との関連も含めて述べる。

#### 9.5.1 神経系

i) 有機リン系殺虫剤 酸化的脱硫による毒性発現の最も代表的な例は、農薬、有機リン系殺虫剤の暴露による神経障害である。有機リン系殺虫剤の一般化学構造式は図9・11に示す通りで、 $R_1, R_2$ は通常メトキシあるいはエトキシ基で、 $R_3$ は逆離基として種々のアール基を導入することにより、数多くの農薬が開発されている。ホスフエート型殺虫剤は直接、またホスホロチオノ型殺虫剤は酸化的脱硫反応を受け、対応するオキソソルホキシドへ代謝されアセチルコリンエステラーゼを阻害する。その結果、神経伝達物質アセチルコリンが加水分解されないため、その過剰蓄積による痙攣、流涎、気管支分泌亢進など多様な神経症状が誘発され、重篤な場合は呼吸麻痺により死に至る。第二次世界大戦後にわが国でも市販されたパラチオン、メチルパラチオン、テトラエチルピロリン酸 (TEPP) などは、強毒性で、急性中毒による数多くの犠牲者が出た。現在これらの殺虫剤は特定毒物として規制され使用禁止となっている。その後フェニトロチオン、マラチオンなど低毒性の選択毒性に優れた農薬が使用され、安全性が確立されているが、自殺企図など意図的な急性暴露による中毒の危険度は高い。最近の食品汚染の例として、2007年から2008年にかけて、中国製輸入きょうざを食した人たちが中毒症状を呈し、製品からわが国では承認されていない有機リン系殺虫剤 マタミドホスが検出されて大きな社会問題となった。

図9・11に代表的な例としてフェニトロチオンの代謝を示した。図示したように、フェニトロチオンはP450による酸化的脱硫反応によりフェニトロオキシソルホキシドに代謝され、アセチルコリンエステラーゼを阻害し、毒性を発現する。フェニトロチオンは脱メチル反応により毒性が消失するし、またフェニトロオキシソルホキシドも加水分解

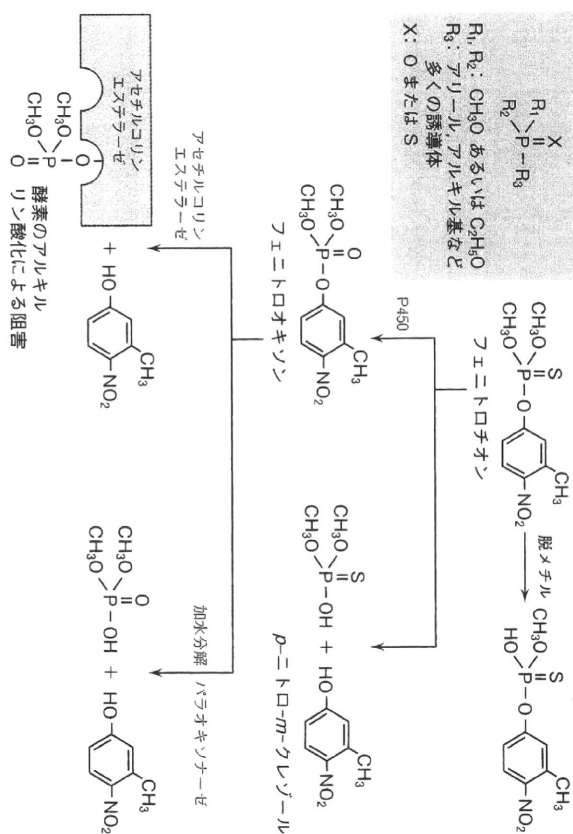


図9・11 有機リン系殺虫剤の一般化学構造 有機リン系殺虫剤の代表例としてフェニトロチオンの代謝を示す。有機リン系殺虫剤のホスホロチオノ型はいずれもP450により酸化的脱硫を受け、対応するオキソソルホキシドへ代謝されアセチルコリンエステラーゼを強く阻害し毒性を発現する。

を受けると作用が消失する。このようにパラチオンなどに比較して低毒性化されている有機リン系殺虫剤は、無毒化につながる生体内代謝が速やかに行われる。

有機リン系殺虫剤の急性中毒に対しては、硫酸アトロピンおよび解毒薬ヨウ化アラリドキシム (PAM, 2-ピリジンアラリドキシムメチオジド) を用いて治療する。PAMはアルキルリン酸化的隣接部位に結合し、阻害を起している物質とも複合体を形成してアセチルコリンエステラーゼと阻害物質との結合を弱め解毒する。アセチルコリンエステラーゼを阻害し神経毒性を誘発する農薬としてはカルバマート系殺虫剤もある。カルバマート系殺虫剤は、その毒性発現に生体内代謝は必要でなく、むしろ代謝により毒性は軽減ないし消失する。

1994年長野県松本市、1995年東京の地下鉄で一般市民が暴露されて死亡者を含む多数の犠牲者を出した神経毒ガス事件で使われたサリンをはじめ、タブン、ソマソおよび VX は、いずれもアセチルコリンエステラーゼを低用量で強力に阻害し、毒性を発現する。これら神経毒ガスの化学構造は図9・12に示す通りである。一方、パラチオン、レプトホス、EPN [O-ethyl O-p-nitrophenyl phenylphos-

## 薬物動態関連遺伝子の多型と薬物相互作用

横井 毅<sup>1)</sup>

**(SUMMARY)** 常用量の薬の服用によっても、薬の血中濃度が異常に高くなることによる副作用の経験者は患者全体の約10%にのぼると言われている。その主たる原因として、薬物動態関連遺伝子の多型が注目され、薬の体内動態と副作用の関係を解析するファーマコゲノミクス(PGx)の研究が進展してきた。遺伝子多型が薬の体内動態に及ぼす影響の程度は、薬によって著しく異なっているため、個々の薬について遺伝子多型と体内動態の変化の相関関係を考慮して最適な個別薬物療法を実施する必要がある。PGxの研究成果は、様々な疾病領域において薬物療法の最適化によって、医療の質の向上に役立っている。また、近年のPGxの研究領域は、次世代シーケンサーによる塩基配列解析の高速化と、non-coding RNAの研究の進展により、新たな展開が始まろうとしている。

(臨床検査 54:1107-1113, 2010)

**(KEYWORDS)** 遺伝子多型, 薬物相互作用, 個別薬物療法, ゲノム薬理学

### はじめに

日常的に処方される薬による症状の改善の程度は患者によって著しく異なり、疾病によっては患者の半分以上に薬効が認められない場合も珍しくないとされている。臨床において、薬は単独ではなく併用して用いられる場合が多く、相互作用による副作用の原因となる場合がある。臨床における薬物相互作用は薬理活性を中心とした薬力学的機序に起因するものは約3割にとどまっており、7割以上は薬物動態学的機序に起因すると言

われている。さらに、その90%以上は薬の代謝過程を介した相互作用が関与していると言われている。

近年、ファーマコゲノミクス(PGx)の研究は薬の副作用を遺伝子多型から予測診断し、個別薬物療法を最適化することを目指して進展してきた。遺伝子多型と副作用の関係については、薬物動態の研究領域が最も早くから展開されており、とりわけチトクローム(CYP)をはじめとした薬物代謝酵素の研究が進展しており、膨大な数の報告がある。

売り上げ上位200種類の薬では、体内からの消失の73%に代謝が関与しており、その80%以上にCYPが関与している。そのうち46%がCYP3A, 16%がCYP2C9, 12%がCYP2C19, 12%がCYP2D6によって代謝される薬であり、遺伝子多型の影響が大きいと考えられる<sup>1)</sup>。さらに、CYPに起因する遺伝子多型や薬物相互作用により、市場から撤退した薬も多い<sup>1)</sup>。一方、1995~2000年の18の副作用調査と論文報告においては、副作用が報告されたすべての薬の59%が遺伝子多型を示す酵素によって代謝されるものであった<sup>2)</sup>。2004年と2005年の2年間に、米国で患者が救急医療扱いになった薬の副作用事例は、インシュリンに次いでワルファリンが多く(推定43,400件)<sup>3)</sup>、これにはCYP2C9とVKORC1(vitamin K epoxide reductase complex 1)の遺伝子多型が関与している。遺伝子多型に起因する個人差の情報を薬物療法および医薬品開発に反映させることは、副作用を回避し、薬を有効利用するために重要である。

1) 金沢大学医薬保健研究域薬学系薬物代謝化学研究室・教授



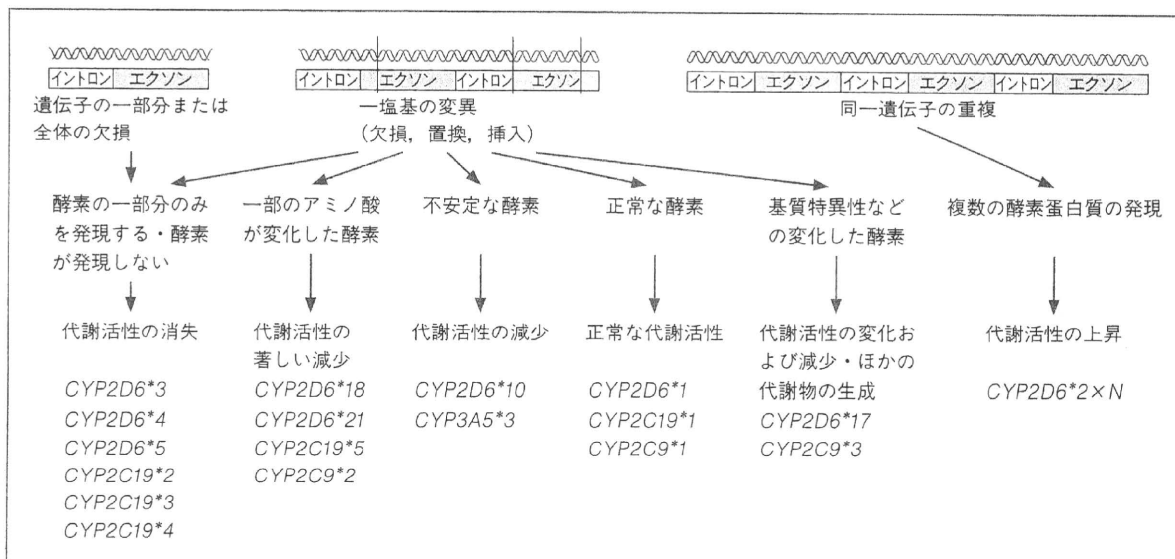


図1 CYP2C9, CYP2C19 および CYP2D6 の代謝活性に影響を及ぼす代表的な遺伝子変異

## ● 遺伝子多型情報による ● 副作用回避

遺伝子多型の情報を、薬物相互作用や副作用の発現の回避に役立てることを目的に、進展しつつある PGx の研究分野の現況について考える。

### 1. 遺伝子多型と表現型

遺伝子多型の判定によって、PM (poor metabolizer: 代謝能の著しく低いヒト) と EM (extensive metabolizer: 代謝能の正常なヒト) の表現型を明確に予測し得ることが必要である。薬の血中濃度推移が表現型の指標として一般的に用いられる。

現況では、遺伝子の変異型の情報は多いが、個々の変異型が薬の体内動態に及ぼす影響の程度については、情報が不足している場合が多い。例えば不整脈治療薬、抗精神病薬や抗うつ薬を特異的に代謝することで知られる CYP2D6 には現在までに約 80 種類の遺伝子変異が報告されている<sup>4)</sup>。しかし、これらの変異がヒトでの薬の血中濃度に及ぼす影響の程度についての報告は半分にも満たない。遺伝子解析が先行しており、多くの遺伝子変異が見いだされてきているが、その変異が実際のヒト *in vivo* の血中薬物濃度に及ぼす影響についての研究実施には多くの労力が必要であるため、進展が遅れている。

遺伝子多型の出現頻度と種類には著しい人種差が存在するため、日本人における研究が必要とされている。CYP2D6 の PM の頻度は欧米人で 4~5% であるが、日本人では 0.5% 未満である。さらに、CYP2D6 の変異の種類については、欧米人においては、CYP2D6\*3, \*4 と \*5 (全欠損型) の 3 種類によって PM の約 95% を診断することが可能であり、さらに CYP2D6\*6 と \*7 を加えることにより、ほぼすべての PM の診断が可能である<sup>5)</sup>。一方、日本人では PM の頻度が低いことに加え、多種類の遺伝子変異が存在するために、少なくとも CYP2D6\*2, \*3, \*4, \*5, \*10, \*14, \*18 および \*21 の判定が推奨され、極めて複雑である。

図 1 には、遺伝子変異の種類の概略と、遺伝子変異が酵素蛋白質の性質に及ぼす影響について示した。遺伝子の部分欠損または全欠損によって、酵素活性が欠損する場合や、酵素蛋白質が不安定になる場合や、遺伝子が重複して活性が上昇する場合など様々である。日本人の PM の頻度が低いために、研究が比較的困難であるため、まだ未知の遺伝子変異が存在する可能性もある。近年、CYP2D6 の変異型を点数化し、正常型の半分の代謝能や、倍の代謝能などに見積もる方法が提唱されている<sup>6)</sup>。また、どんな遺伝子にも常に未知の変異が存在することがあるため、予期せぬ副作用発現の可能性のあることに注意しなくてはなら

ない。薬物代謝酵素のみならず、薬物の受容体や薬物トランスポーターの遺伝子多型によって、薬理効果や副作用発現に影響を及ぼすことも報告されているが、報告例は少ない。

## 2. 表現型に影響する因子

薬の体内動態は多くの因子の影響を受けて変化する。飲酒、嗜好品、喫煙、食事、環境因子や併用薬のみならず、年齢、栄養状態や疾病など様々な遺伝子多型以外の因子も、表現型である薬の体内動態に影響を与えることが知られている。特に、病態や飲食物が薬物代謝酵素の表現型に及ぼす影響は無視できない場合があることが知られており、多くの報告がある。しかし、臨床研究には多大な労力が必要であるため、プロスペクティブ(前向き)の臨床研究はほとんど行われていないのが現状である。当該薬についての報告が一般的に受け入れられている事象であるか、または特殊な事例であるかに注意をして情報を解釈する必要がある。疾病時の代謝能と遺伝子型の相関についての情報が最も不足しており、今後さらに情報を蓄積することが求められている。

## 3. 薬の選択と投与量

同じ代謝酵素で特異的に代謝される複数の薬を比較した場合、同じ遺伝子多型に対しても、体内動態への影響が異なることに注意が必要である。すなわち、薬によって体内動態の変化の程度は異なるために、個々の薬についてのデータが必要となる。しかしながら、現実にはPMの患者への投与量を明記している薬はない。例えば、多動性障害の治療薬であるアトモキセチンは、米国で承認時から添付文書には、CYP2D6のPMとEMでAUCが約10倍異なることや、 $t_{1/2}$ とCmaxが5倍異なることが明記され、パロキセチン(CYP2D6の阻害作用を示す)併用患者やPMに対する投与時の注意が喚起されている<sup>7)</sup>。これは、アリピプラゾール(統合失調症治療薬)とともに、初めて添付文書にPM、EMが明記されたものである。しかし、CYP2D6のPM患者やパロキセチンなどを併用している患者に対する具体的な推奨投与量は記載されていないために、遺伝子多型の情報は、臨床現場では直接役には立たない場合が多い。様々な要因が個体差へ与える影響を考慮すると、用量の明記は難しいと考えられる。

表 CYP2D6の多型を考慮した投与量の補正值(%)

抗うつ薬	PM	IM	FM	UM
イミプラミン	30	75	130	180
トリミプラミン	37	83	125	175
デシプラミン	40	76	117	165
ノルトリプチリン	48	90	115	155
クロミプラミン	60	85	112	145
パロキセチン	65	90	108	143
アミトリプチリン	70	90	105	135
ミアンセリン	70	87	110	135
抗精神病薬	PM	IM	EM	UM
ペルフェナジン	30	80	130	170
チオリダジン	37	82	127	165
オランザピン	50	100	120	155
フルペンチキソール	68	80	117	135
ハロペリドール	67	90	108	126

フルオキセチン、プロピオン、シタロプラム、セルトラリン、ペラジン、クロザピン、オランザピンなどは、CYP2D6の多型により投与量を補正する必要がないと考えられる。

しかし、確実な臨床試験データの裏付けなしでは、遺伝子診断でPMと判定しても、実際に用量設定が難しい。

こうした問題を解決するためには、前向きの臨床試験が必要であるが、臨床試験には多大な労力と費用を要するために、情報の蓄積が進んでいないのが現状である。Kirchheinerら<sup>8)</sup>は、抗うつ薬と抗精神病薬の体内動態に関して、メタ分析を行いCYP2D6のPM、IM(intermediate metabolizer)、EMとUM(ultra rapid metabolizer)に対する推奨投与量を報告している(表)。イミプラミンはPMとUMで推奨投与量が6倍異なっている。注目すべきは、同じCYP2D6で代謝される薬でも、遺伝子多型を考慮する必要がある薬と、必要がない薬について明確に述べられており、「個々の薬によって遺伝子多型が動態に及ぼす影響が異なる」という情報が詳しく整理されている。今後、この論文に基づいて、日本人における前向き臨床試験が待たれる。

実際に本邦の臨床現場で遺伝子診断が実用化されているものは、2008年11月に塩酸イリノテカンの副作用予測のためにUGT1A1の遺伝子多型検査が保険適用とされたものと、ピロリ菌除菌のオメプラゾール投与時のCYP2C19の多型診断(先進医療認定)にとどまっている。FDAは、CYP2D6(33種類の多型)とCYP2C19の遺伝子

多型を診断するマイクロアレイを認可し、EUでも体外診断薬として初めて発売を認可した<sup>9)</sup>。しかし、これらの診断結果は個別薬物療法のための補助的診断材料として用い、測定結果のみを根拠に用量を決めてはならないことを明記していることも、上記の理由から当然のことと思われる。

#### 4. 信頼性とプライバシーの確保

近年の技術進歩により遺伝子診断を安価で迅速に行うことについては、問題は少ないと考えられる。しかし、結果の信頼性の確保は重要であり、近い将来、判定方法、再現性の検証、評価法、提示法、保存法などの統一化が図られる必要があると考えられる。もちろんプライバシーの確保など倫理面の適切な対応も必須である。本邦では、2009年に改訂『ファーマコゲノミクスの運用指針』が策定され、整備が進んでいる。また、多型判定用の標準ゲノムの使用も、標準化の推進に必要である。

### ● 次世代シーケンサーが ● もたらす新しい展開

2006年頃からゲノムの解析スピードが飛躍的な進歩を遂げつつあることは特筆に値する。これにより、ゲノムワイド関連解析(GWAS: genome-wide association study)を研究に適用することが可能になり、2007年頃より、目を見張る成果が報告されるようになってきた。GWASの研究手法は、“次世代シーケンサー”と言われる塩基配列解析機器の性能の飛躍的な進歩によってもたらされたものである。現在は500~1,000万円の費用がかかるヒトの全ゲノム解析が、5~10年後には10万円でできる時代になると予想されている。従来の候補遺伝子アプローチ(candidate gene association study; CAGS)では、特定のターゲットや事象について機能解析や動物モデルから得られる情報を検討し、その候補遺伝子およびその関連遺伝子の多型や変異について患者(case)と非発症患者または正常人(control)で比較する研究手法が行われてきた。しかし、GWASでは、全く予期せぬ新規のバイオマーカーや関連遺伝子が、高いodds比と有為差で見いだされ、癌、HIV、アルツハイマーや

パーキンソン病などで報告が相次いでいる。こうした進歩は、ゲノム薬理学にも変革をもたらしつつある。

アセトアミノフェン(APAP)は、CYP1A2、CYP2E1およびCYP3A4によって代謝され、不安定な反応性中間体であるNAPQI(N-acetyl-p-benzoquinonimine)が生成されることが肝障害の原因であり、特にCYP2E1の活性が肝障害のリスクと相関することが知られている。しかし、GWASでは白血球抗原86、カルパイン8、および細胞接着因子であるCD44とCD59aがAPAPの肝障害感受性バイオマーカーであるという結果をHarrillら<sup>10)</sup>は報告している。さらに、CD44には一塩基変異多型(single nucleotide polymorphism; SNP)が知られており、1日4gのAPAPを7日間服用するヒト臨床試験の結果、CD44のSNPによって肝障害の程度が有為に変化することを見いだした。APAP由来肝障害において、動態関連因子以外の関与を明確に示した例である。今後は、従来の動態因子とCD44のSNPを併せて評価することにより、より精度の高い予測が可能になることが期待される。

最近では、抗菌薬フルクロキサシリンが組織適合抗原HLA-B\*5701型のヒトに、オッズ比80.6という極めて高い確率で肝障害発症の危険性があることを報告している<sup>11)</sup>、さらにトロンビン阻害薬として期待されていたキシメラガトランが、DRB1\*7とDQA1\*02がいずれもオッズ比4.4で肝障害の危険性を説明できることが報告され<sup>12)</sup>話題を集めている。いずれも薬物代謝およびトランスporter関連因子では全く説明ができない、いわゆる特異体質性(idiosyncratic)肝障害に分類される事象について新規のバイオマーカーとなる。これらの組織適合抗原の遺伝子型判定は、薬物性肝障害の発症を予測できるバイオマーカーとしての臨床上の価値は極めて高いと考えられる。なお、肝障害発症のメカニズムとこれらの新規バイオマーカーとの関連性の解明は今後の課題である。

次世代シーケンサーの応用によって、蛋白質をコードするRNA以外のnon-coding RNAの網羅的配列解析や<sup>13)</sup>、選択的プライス部位のゲノムワイドな解析や<sup>14)</sup>、ヒストンの修飾やメチル

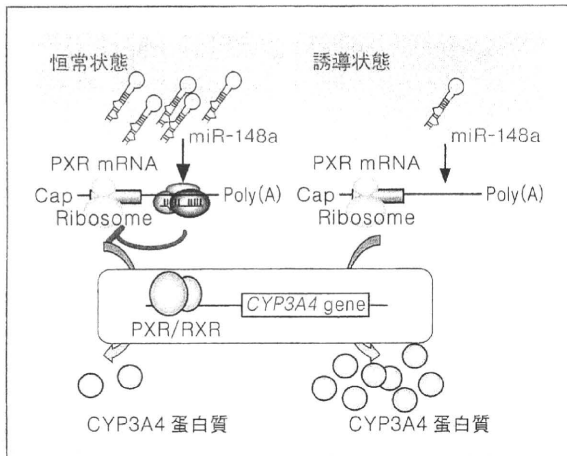


図2 マイクロRNAが関与するヒトCYP3A4の新規転写調節機構

PXRは、CYP3A4の5'-非翻訳領域に結合して発現調節を担っている核内転写因子である。PXRは、その3'-非翻訳領域に結合するmiR-148aによって発現制御されており、PXRの発現量の個人差が、CYP3A4の大きな個人差の原因の1つである。

化部位の網羅的解析<sup>15)</sup>が可能になりつつある。こうした超高速化の解析手法により、遺伝子多型による影響を、薬物動態関連遺伝子のみならず、広範に捉えることが可能になり、PGxの新たな研究展開が期待される。

## ● マイクロRNAによる ● 新たな研究展開

マイクロRNA(microRNA; miRNA)は22塩基程度のnon-coding RNAであり、標的となるmRNAの主に3'-非翻訳領域に部分相補的に結合し、翻訳を抑制またはmRNAを分解することにより発現を負に制御する。マイクロRNAは細胞の分化、発生など様々な生命現象の制御を担っており、マイクロRNAによる制御システムの異常が癌や糖尿病など多くの疾患の発症や進展にかかわることが明らかにされつつある。ヒトではこれまでに700種類以上のマイクロRNAが同定されており、ヒト遺伝子の30%以上がマイクロRNAによって制御されていると推定されている。個々の遺伝子についての解明は始まったばかりの状態であり、情報は十分ではない。

筆者らは、アセトアミノフェンやハロタンの代謝に関与するヒトCYP2E1がmiR-378によって

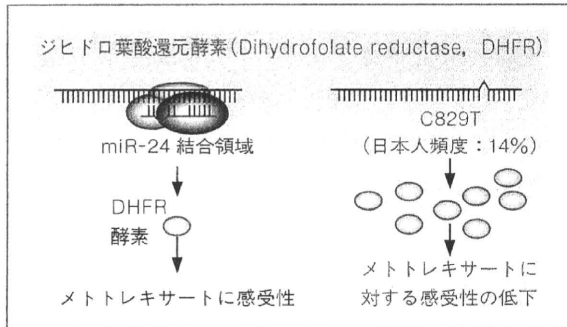


図3 薬物療法に直接影響を及ぼすマイクロRNA結合領域のSNP

ジヒドロ葉酸還元酵素の遺伝子の3'-非翻訳領域にmiR-24結合領域がある。その領域に存在するSNPが、miR-24による抑制的発現調節に関わっているために、抗癌薬メトトレキサートの感受性の個人差の原因となっている。

制御されていること<sup>16)</sup>、芳香族多環炭化水素類の代謝的活性化を担うヒトCYP1B1がmiR-27bによって制御されることを明らかにしてきた<sup>17)</sup>。また、臨床で使用される薬の半数以上の代謝に關与するCYP3A4の活性には大きな個人差が存在することが知られている。肝マイクロゾームレベルで50倍以上、ヒト*in vivo*で5~8倍の個人差があると言われている。ヒトCYP3A4には、20種類以上の遺伝子多型が知られているが<sup>18)</sup>、その頻度は極めて低く、さらに*in vivo*で活性に影響する多型はほとんどなく、CYP3A4の個人差の原因は未解明であった。筆者らは、CYP3A4を誘導する転写因子であるPXR(pregnanane X receptor)が、miR-148aによって制御されていることを見いだした。さらに、miR-148aによって制御されるPXRが、CYP3A4の誘導時のみならず、恒常的発現にも大きく影響していることを見いだした(図2)<sup>19)</sup>。一連の*in vitro*の研究結果は、CYP3A4の大きな個人差の解明の糸口になると期待される。

抗癌薬メトトレキサート(MTX)の標的分子であるジヒドロ葉酸還元酵素(dihydrofolate reductase; DHFR)は、miR-24によって抑制的に発現制御されており、さらに、その3'-非翻訳領域にC829TのSNPがあり、この部分がmiR-24の結合部位であるためにT型のヒトにはDHFRが高発現していることが、Mishraら<sup>20)</sup>によって見いだされた(図3)。日本人の14%がこのT型のSNPを有しており、それらのヒトはDHFR

の発現量が高いために、メトトレキサートに対して治療効果が期待できないことが明らかにされた<sup>20)</sup>。将来、この SNP の影響を詳しく評価し、患者の利益になる場合には、速やかに遺伝子診断の対象とすべきであろう。

## ● ● ● おわりに

遺伝子多型の情報を個別薬物療法に反映し、副作用のリスクを軽減することが臨床適用され始めている。さらなる充実のためには、ヒトにおける血中薬物濃度推移などの表現型と遺伝子多型の対応付けの詳しい臨床研究の推進が必要である。薬物動態関連遺伝子のみならず、HLA の SNP やレセプター遺伝子の多型など、臨床で活かせる情報が蓄積しつつある薬の数は増えてきており、FDA も高い関心を示している<sup>21)</sup>。複数の多型判定を組み合わせることにより、より良い予測が得られる場合も少なくない。新たなバイオマーカーに対して、速やかな対応ができるように準備が必要な時期であると考えられる。

UGT1A1 と塩酸イリノテカンの論文<sup>22)</sup>が 2000 年に発表されてから約 10 年後に臨床で活用されるようになってきた。ピロリ菌の除菌療法についても同様である。今後は、基礎研究の成果が臨床に速やかに活かされるために、臨床研究者のみならず、情報提供にかかわるすべての職種の連携を進める体勢の整備も必要である。本稿の後半で述べた PGx 研究分野の新しい展開の成果も、近い将来に臨床に反映されることであろう。

### 文 献

- 1) Wienker LC, Heath TG : Prediction in vivo drug interactions from *in vitro* drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov* 4 : 825-833, 2005
- 2) Phillips KA, Veenstra DL, Oren E, et al : Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *JAMA* 286 : 2270-2279, 2001
- 3) Budnitz DS, Pollock DA, Weidenbach KN, et al : National surveillance of emergency department visits for outpatient adverse drug events. *JAMA* 296 : 1858-1866, 2007
- 4) <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm> (2010 年 6 月 28 日現在)
- 5) Murphy MP, Beaman ME, Clark LS, et al : Prospective CYP2D6 genotyping as an exclusion criterion for enrollment of a phase III clinical

- trial. *Pharmacogenetics* 10 : 583-590, 2000
- 6) Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, et al : The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther* 83 : 234-242, 2008
- 7) <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm107912.htm> (2010 年 6 月 28 日現在)
- 8) Kirchheiner J, Nickchen K, Bauer M, et al : Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variants to the phenotype of drug response. *Mol Psychiatry* 9 : 442-473, 2004
- 9) [http://molecular.roche.com/diagnostics/genomics\\_oncology/ampliChip\\_CYP450.html](http://molecular.roche.com/diagnostics/genomics_oncology/ampliChip_CYP450.html) (2010 年 6 月 28 日現在)
- 10) Harrill AH, Watkins PB, Su S, et al : Mouse population-guided resequencing reveals that variants in CD44 contribute to acetaminophen-induced liver injury in human. *Genome Res* 9 : 1507-1515, 2009
- 11) Kindmark A, Jawaid A, Harbron CG, et al : Genome-wide pharmacogenetic investigation of a hepatic adverse event without clinical signs of immunopathology suggests an underlying immune pathogenesis. *Pharmacogenomics J* 8 : 186-195, 2008
- 12) Daly AK, Donaldson PT, Bhatnagar P, et al : HLA-B\*5701 genotype is a major determinant of drug-induced liver injury due to flucloxacillin. *Nat Genet* 41 : 816-819, 2009
- 13) Cloonan N, Forrest AR, Kolle G, et al : Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. *Nat Methods* 5 : 613-619, 2008
- 14) Tsuchihara K, Suzuki Y, Wakaguri H, et al : Massive transcriptional start site analysis of human genes in hypoxia cells. *Nucleic Acids Res* 37 : 2249-2263, 2009
- 15) Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL : TopHat : discovering splice junctions with RNA-seq. *Bioinformatics* 25 : 1105-1111, 2009
- 16) Mohri T, Nakajima M, Fukami T, et al : Human CYP2E1 is regulated by miR-378. *Biochem Pharmacol* 79 : 1045-1052, 2009
- 17) Tsuchiya Y, Nakajima M, Takagi S, et al : MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P4501B1. *Cancer Res* 66 : 9090-9098, 2006
- 18) <http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a4.htm> (2010 年 6 月 28 日現在)
- 19) Takagi S, Nakajima M, Mohri T, et al : Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by micro-RNA affects the expression of cytochrome P 450 3A4. *J Biol Chem* 283 : 9674-9680, 2008
- 20) Mishra PJ, Humeniuk R, Mishra PJ, et al : A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dehydrofolate reductase gene leads to meth-

otrexate resistance. Proc Natl Acad Sci USA 104 : 13513-13518, 2007

- 21) [http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm?sms\\_ss=email](http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm?sms_ss=email)(2010年6月28日現在)
- 22) Ando Y, Saka H, Ando M, et al : Polymorphisms of UGT-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity : a pharmacogenetic analysis. Cancer Res 60 : 6921-6926, 2000

### Summary

Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and drug interactions

Tsuyoshi Yokoi<sup>1)</sup>

Pharmacogenetic polymorphisms are known affecting biotransformation of drugs and clinical outcomes. Pharmacogenomic information is contained now in about 10% of labels for drug approved by the FDA. A significant increase of labels containing such information has been observed over the last decade. Many

reports suggest that genetically determined metabolic capacities of drug-metabolizing enzymes have the potential to improve individual benefit and risk relationship. However, more and more prospective studies with clinical endpoints are needed to actualize 'personalized medicine'. Recently, genome-wide association studies (GWAS) have matured into effective tools for mapping genes to examine pharmacogenetic traits, including drug metabolism, efficacy, and toxicity. GWAS is a very powerful tool to elucidate new biomarkers with high odds ratio. On the other hand, microRNA are a group of non-coding RNAs with modulator activity of gene expression. We found that miRNA-dependent regulation of CYPs and nuclear receptors is toxicologically and pharmacologically important. Recent new approaches have provided new insight into the mechanism of interindividual difference of gene expression including drug-metabolizing enzymes.

[Rinsho Kensa 54 : 1107-1113, 2010]

- 1) Department of Drug Metabolism and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192, Japan

常に携帯可能なコンパクト版が、さらに内容を充実させて登場!

# 臨床検査データブック [コンパクト版] 第5版

監修 高久史磨  
編集 黒川 清・春日雅人・北村 聖

大好評の『臨床検査データブック』本体から『コンパクト版 第5版』が飛び出した! いつでもどこでも必要になる検査を中心に、205項目をセレクト掲載! ポケットに入る判型で、病棟、外来、実習など、常に携帯可能! 今版から新たに小見出し「検査目的」「採取保存」が加わり、さらに内容が充実! 本体と共に読者の臨床をサポートします!

●三五変 頁392 2009年 定価1,890円(本体1,800円+税5%) [ISBN978-4-260-00935-5]  
消費税変更の場合、上記定価は税率の差額分変更になります。



医学書院

〒113-8719 東京都文京区本郷1-28-23

[販売部] TEL: 03-3817-5657 FAX: 03-3815-7804

E-mail: sd@igaku-shoin.co.jp http://www.igaku-shoin.co.jp 振替: 00170-9-96693

携帯サイトはこちら





化合物を医薬品にするために必要な薬物動態試験 (その3) 代謝⑦

第II相代謝の評価と創薬

横井 毅

要約：チトクロム P-450 (CYP) を中心とした前臨床試験スクリーニング系の発達により、第II相代謝酵素で触媒される候補化合物が増加傾向にあると言われている。ヒトにおける代表的な第II相代謝酵素は、グルクロン酸抱合酵素 (UGT) であり、近年多くの研究成果が集積されてきている。しかし、CYP と比べ前臨床試験スクリーニングへの応用は進んでいない。UGT のヒト in vivo 代謝反応の予測系の確立は、UGT の様々な特性が原因で進展していない。特異的阻害薬が無いこと、活性化が認められること、さらに抱合代謝物による UGT 阻害などが試験系を難しくしている。さらに、種差および肝外臓器における情報は極めて少ない。グルタチオン抱合や硫酸抱合代謝物は、排出型トランスポーターの影響を受けるが、体内動態に及ぼす影響の検討が必要である。今後、CYP 等の第I相と第II相酵素反応を同時に考慮できる評価系の構築が期待されている。

1. はじめに

創薬の初期段階において薬物動態に起因する問題で開発中止になる事例は、近年著しく減少したと言われている。その理由は第I相薬物代謝酵素、特に CYP を中心とした基礎研究が長足の進展をしたことにあり、創薬初期段階のみならず臨床での副作用発現の回避に至るまで、幅広い貢献をしている。近年、創薬初期段

階において CYP に起因する酵素誘導や阻害の問題を起こす可能性がある化合物はスクリーニングで排除されている。その結果、代謝反応を受け難い化合物や、CYP 以外の代謝酵素で触媒される化合物が増加傾向にある。

第II相抱合代謝酵素として、UGT、硫酸抱合酵素 (SULT)、グルタチオン抱合酵素 (GST)、アセチル抱合酵素 (NAT)、アミノ酸抱合やメチル抱合を触媒する酵素等が知られている。図1には、世界のトップ200の医薬品の主要代謝クリアランス等について示す(1)。全クリアランスのうち代謝が約72%を占め(図1A)、そのうち約70%がCYPであり、次にUGT、エステラーゼ、フラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO)、NAT、モノアミンオキシダーゼ (MAO) の順である。第II相酵素ではUGTが主要代謝酵素(全体の約15%)であり、次いでNAT(全体の約2%)である(図1B)。その他の第II相代謝酵素の関与は、トップ200の医薬品では報告されていない。また、ヒトでの第II相代謝酵素に起因する相互作用のほとんどにUGTの関与が報告され、抱合代謝全体の約40%をUGTが担っているという報告もある(2)。従って、開発時において最も注意を要する第II相代謝酵素はUGTであり、本稿ではUGTの評価と医薬品開発を中心に述べる。

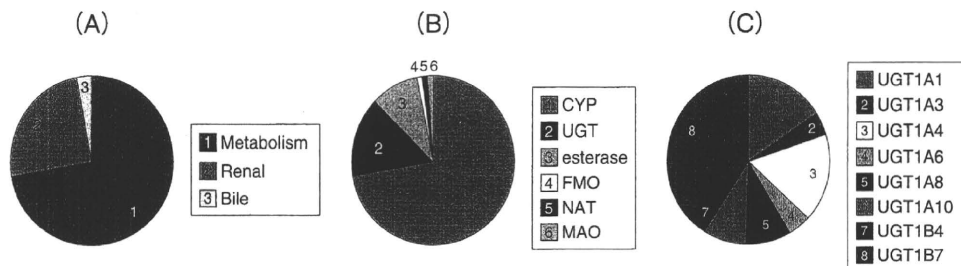


図1 世界のトップ200の医薬品の主要代謝クリアランス (文献1より改変)

キーワード：グルクロン酸抱合、硫酸抱合、動態予測  
 金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 薬物代謝化学研究室 (〒920-1192 金沢市角間町)  
 E-mail: tyokoi@kenroku.kanazawa-u.ac.jp 原稿受領日：2009年8月6日、依頼原稿  
 Title: Evaluation of phase II drug metabolizing enzymes in the discovery stage. Author: Tsuyoshi Yokoi

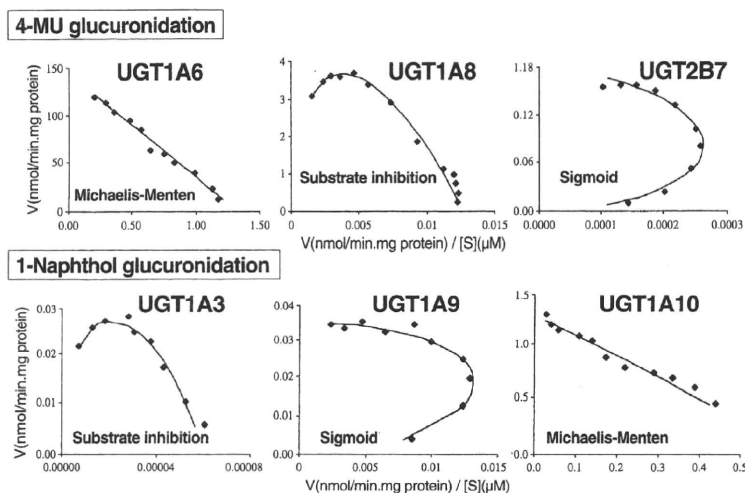


図2 UGT分子種発現系による4-MUと1-ナフトールのグルクロン酸抱合反応のEadie-Hofsteeプロット(文献7より改変)

## 2. グルクロン酸抱合酵素 (UGT)

UGTは、フェノール基やアルコール基に対してO-グルクロン酸抱合、カルボン酸に対してエステル型グルクロン酸抱合、第1～3級アミンに対してN-グルクロン酸抱合を触媒することが知られている。UGTにはUGT1とUGT2ファミリーがあり、UGT1は1つの遺伝子から13種類の異なったエクソン1の選択的スプライスによって多くの分子種が発現し、エクソン2～5は同じ配列である。UGT2は6つのエクソンから成る通常の遺伝子構造である。UGTは一般に基質特異性が低いことが知られている。1種類のUGTがいずれの反応をも触媒したり、1つの代謝経路に複数のUGTが関与する場合も多い。肝と小腸に高い活性があり、UGT1A8やUGT1A10は小腸に高く発現し、肝では発現していない。

### 1) UGTの活性測定

UGTは小胞体膜内側に存在しているために、*in vitro*での活性測定には補酵素であるUDP-グルクロン酸(UDP-GA: 3-5 mM 添加)や基質との反応性を上げる為に、小胞体膜に穴を開ける試薬であるアラメチン(30-50 μM/mg protein 添加)を加える必要がある。酵素源としては、市販品であるヒト肝マイクロソーム、各分子種発現系酵素またはヒトヘパトサイトを用いる。ヘパトサイトには補酵素を加える必要はないが、極めて高価であるために使用が限られる傾向にある。固有クリアランスの算出には、基質の減少で測定する方法もあるが、様々な理由から推奨できない。とりわけ阻害試験には必ず代謝物を指標として検討する必要がある。しかし、多くの場合には代謝物が市販されていないために、グルクロン酸結合を切る酵素であるβグルクロニダーゼ処理後、HPLC等を用いて標品を精製し

て定量に供する必要がある。

*In vitro*での試験結果から*in vivo*クリアランスを予測することは、CYPの場合よりもかなり困難である。*In vitro*ではアラメチンを必要とするほど基質と酵素の反応性が悪いために、予測値は*in vivo*の実測値をはるかに下回ることが多い。肝マイクロソームでは、 $K_m$ 値が10倍以上高いこともある。従って、より*in vivo*に近い値を得られるヒトヘパトサイトの使用が推奨されるが、大きな個人差の影響を考慮する必要がある。マイクロソームの反応系に2%の牛血清アルブミンを添加すると改善される場合もあるが、非結合型の濃度の考慮が必要となり(3)、基質によっては反応性の改善が認められない場合もある。さらに、*in vitro*の反

応において、UGT酵素が活性化されて予期しない高い活性が認められる場合がある(4)。この活性化は、一定の範囲内の基質濃度のみで認められる場合が多く、基質濃度を変化させた検討が必要である理由の一つである。さらに、グルクロン酸抱合代謝物が、特定のUGT分子種に対してのみ強い酵素阻害を示すことも珍しくない(5)。さらに、補酵素の分解物であるUDPが他の分子種の活性阻害に働くことも知られているが(6)、この現象は反応液中での総活性値が高い場合に認められる。同じ基質に対して、異なる分子種が様々なキネティックを示すことも念頭に置く必要がある(図2)(7)。以上のように、UGTの活性測定に際しては、多くの因子による影響に十分に注意を払う必要がある。

### 2) UGT分子種同定と阻害試験

開発候補化合物の主代謝分子種の同定方法はCYPの場合と同様である。しかし、UGTは分子種間の基質認識の特異性が低いために、より注意して実施することが肝要である。ヒト肝マイクロソームにおける各分子種特異的な基質として、UGT1A1にはビリルビンまたはエストラジオール、UGT1A3にはトリフルオロペラジン、UGT1A9にはプロポフォル、UGT2B7にはモルフィンまたはジトブジンを使用するが、市販のヒト肝マイクロソームには各活性がデータシートとして添付されるようになってきた。これらを用いて、開発候補化合物のグルクロン酸抱合活性と各分子種の活性との相関を検討する。この時にヒト肝マイクロソームの検体において、各分子種の活性値が適度に分散している必要がある。

UGT分子種発現系を用いて開発候補化合物を代謝させ、分子種を同定する。この場合にもUGTの低い基質特異性を考慮する必要がある。i*in vivo*推定 $K_m$ 値だけではなく、高い基質濃度でlow affinityの関与も



必ず検討する必要がある。

阻害試験は特に慎重に実施する必要がある。UGTの分子種特異的な阻害薬は殆ど知られていない。従って、基本的には high affinity の基質を阻害薬として用いる検討方法が実施される。さらに、肝ミクロソームと UGT 発現系の両者での阻害定数を比較検討する必要がある。こうした検討でも説明が難しい結果が得られることもあり、これには肝ミクロソームと UGT 発現系の両者における膜環境の差異が影響していると考えられ、さらに、別の複数の種類の基質兼阻害薬について、 $K_m$ 、 $IC_{50}$  および検出限界値を考慮して検討する必要がある。

### 3) UGT と薬物間相互作用

UGT に起因する薬物間相互作用の臨床例は CYP と比較して著しく少なく、その程度も軽いとされている(1)。臨床例のまとめが Kiang らによって報告されている(8)。開発候補化合物において、グルクロン酸抱合が主消失経路であり、単一分子種で触媒される場合には、薬物間相互作用を想定した検討が必須である。中でも、内因性基質であるビリルビンを抱合解毒できる分子種は UGT1A1 のみであるために、阻害により高ビリルビン血症が惹起される場合がある(9)。また、CYP による代謝物が UGT1A1 を強く阻害することが高ビリルビン血症の原因となる場合もあるので注意が必要である(10)。

モルフィンを基質とする UGT2B7 は、アシルグルクロナイド生成反応を最も効率的に触媒する分子種である。UGT1A3 もその触媒活性を少なからず有している。アシルグルクロナイドの毒性評価方法については確定していない。開発候補化合物やその代謝物がカルボン酸を有する場合が多いため、今後の定量的な毒性評価の確立が待たれている(11)。

UGT は PXR (pregnane X receptor) や CAR (constitutive androstane receptor) によって発現調節をされているために、こうした転写因子の発現に影響を及ぼす化合物について、開発段階で考慮する必要がある。転写因子が抱合酵素の活性に及ぼす影響の定量的評価法は確立されていない。さらに、UGT は Nrf2 (NF-E2-related factor 2) によって発現調節を受けており、キノン、カテコール、パーオキシドなどの親電子性化合物類によって誘導を受け、解毒能に影響を及ぼすことが考えられる。

遺伝子多型については、体質性黄疸に関連する多型が、Grigler-Najjar 症候群や Gilbert 症候群について詳しく研究されている(12)。我が国では、塩酸イリノテカンの投与患者について、UGT1A1\*28 の遺伝子診断の実施についての保険適用が 2008 年 11 月から認可されている。

### 4) UGT の種差と臓器分布

種差については、詳しい研究情報が極めて少ないの

が現状である。ラットの分子種数は、マウスに比較して報告が少ない(13)。ラットおよびマウスの肝ミクロソームではイミプラミンやトリフルオロペラジンのグルクロン酸抱合活性は検出できない。肝ミクロソームにおけるエストラジオールのグルクロン酸抱合活性の  $K_m$  は、ヒトと同程度であるが、 $V_{max}$  はヒトの 15 倍ほど高い(14)。

In vitro からヒト in vivo への外挿を目指した in silico 系の開発には、正確なクリアランスの予測が必要である。そのためには、肝外組織、特に腸管組織における第 II 相代謝酵素についても詳しい定量的検討が必要であるが、研究が進展していない。エストラジオールのグルクロン酸抱合活性のクリアランスは、ヒトでは肝と小腸では、ほぼ同じであるが、ラットおよびマウスでは、小腸より肝で 7 倍ほど高い。他の基質においても同様の傾向が認められる(14)。

実験動物における、UGT 分子種の種類、発現量、基質特異性、さらには発現臓器差についても、さらに詳しく検討し、前臨床開発に資する必要がある。最終的には CYP と同様に relative activity factor (RAF) による予測ができることが望まれている。

### 3. 硫酸抱合酵素 (SULT)

硫酸抱合を触媒する SULT は、主に *p*-ニトロフェノールなどのフェノール性水酸基を有する化合物や、アドレナリン、ドパミンやエストロゲンなどの内因性物質等を基質とする SULT1 ファミリー、アルコール性水酸基や内因性ステロイド類を基質とする SULT2 ファミリーと、アミンを基質とする SULT3 がある。

多くの内因性物質の代謝に主として硫酸抱合が係わることが知られている。しかし、環境化学物質以外の薬物等外来異物の硫酸抱合については殆ど知られておらず、ミノキシジルの他には、タモキシフェン、ラロキシフェンやナプロキセンの代謝の一部に関与しているという報告がある。SULT は食品中に含まれるフラボノイド化合物やポリフェノール化合物によって強く阻害される場合がある。しかし、薬物によってヒト硫酸抱合活性が阻害された報告は無い。さらに、SULT は PXR によって転写調節されているが、PXR を活性化する薬物による相互作用の報告も無いため、現状では前臨床試験段階で特別の注意を払う必要がないと考えられている。

### 4. グルタチオン抱合酵素 (GST)

GST は求核性のグルタチオンと親電子性の化合物との抱合反応を触媒する酵素であり、主に肝可溶性画分に存在する。グルタチオン抱合により化合物の水溶性は著しく上昇し、胆汁や尿中への排泄を促進する重要な解毒排泄機構の一つである。すなわち、GST は主に CYP による薬物の代謝的活性化反応によって生

じた反応性中間体(反応性代謝物)とグルタチオンとの反応を触媒し、核酸がタンパク質などの生体高分子とアダクトを作ること防ぐ作用がある。ヒトGSTには16種類以上の分子種があるが、5種類がメジャーな分子種である。GSTAやGSTM分子種は基質特異性が低い。各分子種について遺伝子多型が報告されており、中でもGSTM1およびGSTT1の完全欠損型のアレル頻度はともに約50%であり、代謝活性は二峰性の分布を示し、遺伝子量効果が強く見られる。GSTM1とGSTT1の両因子を欠損しているヒトは、タクリン(15)やトログリタゾン(16)による薬物性肝障害の頻度が有意に高いことが報告され注目されている。近年、開発初期段階において、主にCYPによって生成される反応性代謝物の生成を*in vitro*試験にて予測する試験が盛んに行われている。この試験は、*in vitro*で反応性代謝物のグルタチオンアダクトを測定するものであり、反応性代謝物類の構造を決定しないで、アダクトに使用されたグルタチオン量をMS/MSで測定する。反応性代謝物の解毒能の個人差と副作用発現の関連に本酵素が関与していると考えられている。

### 5. アセチル抱合酵素 (NAT)

抗不整脈薬プロカインアミド、抗結核薬イソニアジドや炎症性腸疾患治療薬スルファサラゾピリジンは、*N*-アセチル体として尿中に排泄され、アセチル化体比率には著しい個人差が認められることは古くから知られている。これらの反応はNAT2によって触媒され、PM (poor metabolizer) の割合は日本人で約10%である。結核の薬物治療において、イソニアジドとリファンピシンの併用において、NAT2の活性が低いヒトでは、ヒドラジンの生成に起因する肝障害発症のリスクが高くなると報告されている(17)。がん原性アリルアミンやヘテロサイクリックアミンの*N*-水酸化体は、NATが*O*-アシル体にすることによって活性化されるため、専ら発がん性との関連研究が行われているが、基質となる薬の種類は極めて限られている。

### 6. メチル転移酵素

6-メルカプトプリン、6-チオグアニンやアザチオプリンのメチル化を触媒する酵素であるチオプリン*S*-メチル転移酵素 (TPMT) は、PMにおける造血障害などの重篤な副作用発現で有名である。TPMTの活性は赤血球と肝で相関する。日本人で報告されているPM型である\*3Cの遺伝子頻度が0.008であり、患者がこの因子をホモで有するPMである確率は極めて低いが、開発候補化合物の代謝がTPMTでメチル転移を受ける場合には注意が必要である。

生体内物質であるカテコールアミン、*L*-DOPAやメチルドパなどのカテコール類をメトキシ体に変換する肝可溶性画分に存在する酵素であるカテコール*O*-

メチルトランスフェラーゼ (COMT) にも遺伝子多型による個人差が報告されている。エストラジロールから生成するDNA障害性のあるカテコール体への代謝をCOMTが触媒することから、乳がんの発生リスクとの関連が示唆されているが、異物代謝に係わるという報告はない。

### 7. 第II相代謝酵素とトランスポーター

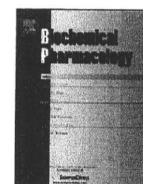
抱合酵素と排出型トランスポーターは機能的に連関していることが、肝臓、小腸や腎臓などで明らかにされて来ている。肝で生成されたグルクロン酸抱合体の多くは、MRP (multidrug resistance-associated protein) 2によって胆汁中に排泄され、MRP1やMRP3によって血漿中に排泄される。グルタチオン抱合体もMRP2やMRP3の基質となる。硫酸抱合体は主としてBCRP (breast cancer resistant protein/ABCG2) の基質となることが報告されている。排出型トランスポーターが薬物の体内動態に及ぼす影響は、開発段階で必要な情報であるが、抱合活性と同時に定量的に評価できる*in vitro*スクリーニング系の確立が今後の課題である。

### 8. おわりに

開発候補化合物が第II相酵素で直接代謝される場合には、当該酵素活性の個人差等の影響を考慮する必要がある。CYPによる代謝物がさらに抱合反応を受けた二次代謝物についても体内動態を考慮しなければならない場合がある。この場合には、最初にヒトおよび実験動物のヘパトサイトを用いて、第I相と第II相代謝酵素を同時に評価することが推奨される。個人差をできるだけ避けるために、ブールドヒトヘパトサイトなどが使われ始めている。今後、各酵素活性のフェノタイプング用プローブ薬やカクテルプローブの開発が必要と思われる。近い将来、第II相酵素がCYPと同じ研究レベルに到達し、第I相酵素と第II相酵素を包括的に考慮できる予測系の開発が望まれる。

### 文 献

- 1) Williams JA, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2004;32:1201-1208.
- 2) Evans W, et al. *Science.* 1999;286:487-491.
- 3) Kilford PA, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2009;37:82-89.
- 4) Yamanaka H, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2005;33:23-30.
- 5) Watanabe Y, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2002;30:1462-1469.
- 6) Fujiwara R, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2008;36:361-367.
- 7) Uchaipichat V, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2004;32:413-423.
- 8) Kiang TK, et al. *Pharmacol Ther.* 2005;106:97-132.
- 9) Zhang D, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2005;1729-1239.
- 10) Katoh M, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2007;35:583-589.
- 11) Skonberg C, et al. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008;4:425-438.
- 12) [http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/sgc/ugt\\_alleles/](http://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/sgc/ugt_alleles/)
- 13) Buckley DB, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2007;35:121-127.
- 14) Shiratani H, et al. *Drug Metabol Dispos.* 2008;36:1745-1752.
- 15) Simon T, et al. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;67:432-437.
- 16) Watanabe I, et al. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;73:435-455.
- 17) Ohno M, et al. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000;4:256-261.



## Human CYP2E1 is regulated by miR-378

Takuya Mohri<sup>a</sup>, Miki Nakajima<sup>a</sup>, Tatsuki Fukami<sup>a</sup>, Masataka Takamiya<sup>b</sup>,  
Yasuhiro Aoki<sup>b</sup>, Tsuyoshi Yokoi<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Drug Metabolism and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192, Japan

<sup>b</sup>Department of Legal Medicine, Iwate Medical University School of Medicine, 19-1 Uchimarui, Morioka 020-8505, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 September 2009

Accepted 20 November 2009

#### Keywords:

miRNA

Cytochrome P450

Post-transcriptional regulation

Liver

Interindividual variability

### ABSTRACT

Human CYP2E1 is one of the pharmacologically and toxicologically important cytochrome P450 isoforms. Earlier studies have reported that the CYP2E1 expression is extensively regulated by post-transcriptional and post-translational mechanisms, but the molecular basis remains unclear. In the present study, we examined the possibility that microRNA may be involved in the post-transcriptional regulation of human CYP2E1. In silico analysis identified a potential recognition element of miR-378 (MRE378) in the 3'-untranslated region (UTR) of human CYP2E1 mRNA. Luciferase assays using HEK293 cells revealed that the reporter activity of the plasmid containing the MRE378 was decreased by co-transfection of precursor miR-378, indicating that miR-378 functionally recognized the MRE378. We established two HEK293 cell lines stably expressing human CYP2E1 including or excluding 3'-UTR. When the precursor miR-378 was transfected into the cells expressing human CYP2E1 including 3'-UTR, the CYP2E1 protein level and chlorzoxazone 6-hydroxylase activity were significantly decreased, but were not in the cells expressing CYP2E1 excluding 3'-UTR. In both cell lines, the CYP2E1 mRNA levels were decreased by overexpression of miR-378, but miR-378 did not affect the stability of CYP2E1 mRNA. In a panel of 25 human livers, no positive correlation was observed between the CYP2E1 protein and CYP2E1 mRNA levels, supporting the post-transcriptional regulation. Interestingly, the miR-378 levels were inversely correlated with the CYP2E1 protein levels and the translational efficiency of CYP2E1. In conclusion, we found that human CYP2E1 expression is regulated by miR-378, mainly via translational repression. This study could provide new insight into the unsolved mechanism of the post-transcriptional regulation of CYP2E1.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Human cytochrome P450 (CYP) 2E1 catalyzes the metabolism of numerous low molecular-weight xenobiotics including drugs (e.g., acetaminophen, isoniazid), organic solvents (e.g., ethanol, acetone, carbon tetrachloride), and procarcinogens (e.g., *N*-nitrosodimethylamine) [1]. CYP2E1 is induced by its own substrates such as isoniazid, ethanol, and acetone, resulting in the enhancement of their metabolism [2]. It should be noted that the induction of CYP2E1 protein by these chemicals was not necessarily accompanied by an increase of CYP2E1 mRNA level [3]. The proposed mechanisms for the induction of CYP2E1 are the stabilization of mRNA [4] or protein [5]. Previously, Sumida et al. [6] reported that the CYP2E1 mRNA levels in 15 human liver samples were not positively correlated with the chlorzoxazone 6-hydroxylase activities, which is a probe activity of CYP2E1. In

addition, special attention should be paid to the fact that CYP2E1 is the most abundant isoform among all P450s in human liver (56% of total P450) at the mRNA level, followed by CYP2C9, CYP2C8 and CYP3A4 (8–11% of total P450) [7], whereas it is the fourth most abundant isoform (about 7% of total P450) at the protein level after CYP3A (30% of total P450), CYP2C (20% of total P450), and CYP1A2 (about 13% of total P450) [8]. Collectively, the post-transcriptional regulation would be responsible for not only the inducible but also the constitutive expression of CYP2E1 in liver. However, the molecular basis of the human CYP2E1 regulation largely remains unknown, in contrast to the other human P450s for which much progress has been made in understanding the regulation mechanisms at the transcriptional level.

To uncover the molecular mechanism of the post-transcriptional regulation of CYP2E1, we sought to determine whether microRNA (miRNA) might be involved in the regulation of CYP2E1. MiRNAs, an evolutionarily conserved class of endogenous ~22-nucleotide non-coding RNAs, recognize the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the target mRNA and cause translational repression or mRNA degradation [9]. The regulation by miRNAs is involved in

\* Corresponding author. Tel.: +81 76 234 4407; fax: +81 76 234 4407.  
E-mail address: nmiki@kenroku.kanazawa-u.ac.jp (T. Yokoi).

diverse biological processes, including development, cell proliferation, differentiation, apoptosis, and cancer initiation and progression [10–12]. The human genome may contain up to 1000 miRNAs and 30% of human mRNAs are predicted to be targets of miRNAs [13]. However, the targets of miRNAs largely remain to be identified. Based on the evidence of the post-transcriptional regulation, we investigated whether miRNAs might be involved in the regulation of human CYP2E1.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Chlorzoxazone, 6-hydroxychlorzoxazone, and coumarin were from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). NADP<sup>+</sup>, glucose-6-phosphate, and glucose-6-phosphate dehydrogenase were purchased from Oriental Yeast (Tokyo, Japan). The pGL3-promoter vector, phRL-TK plasmid, pTARGET vector, and a dual-luciferase reporter assay system were purchased from Promega (Madison, WI). LipofectAMINE2000 and LipofectAMINE RNAiMAX were from Invitrogen (Carlsbad, CA). Pre-miR miRNA Precursors for miR-378 and negative control #1 were from Ambion (Austin, TX). RNAiso, random hexamer, and SYBR Premix Ex Taq were from Takara (Shiga, Japan). ROX was purchased from Stratagene (La Jolla, CA). ReverTra Ace was obtained from Toyobo (Osaka, Japan). All primers and oligonucleotides were commercially synthesized at Hokkaido System Sciences (Sapporo, Japan). G418 was obtained from Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan).  $\alpha$ -Amanitin was purchased from Calbiochem (San Diego, CA). Goat anti-human CYP2E1 polyclonal antibodies and rabbit anti-human GAPDH polyclonal antibodies were from Daiichi Pure Chemicals (Tokyo, Japan) and IMGENEX (San Diego, CA), respectively. Restriction enzymes were from Takara, Toyobo, and New England Biolabs (Ipswich, MA). All other chemicals and solvents were of the highest grade commercially available.

### 2.2. Construction of reporter plasmids

Various fragments were inserted into the *Xba* I site, downstream of the luciferase gene in the pGL3-promoter vector. The sequence from +1559 to +1580 of the human CYP2E1 mRNA (5'-TCA AAT TGT TTG AGG TCA GGA T-3') was termed the miR-378 recognition element (MRE378). A fragment containing three copies of the MRE378, 5'-CTA GAG TTT TCA AAT TGT TTG AGG TCA GGA TTT CTC GTT TTC AAA TTG TTT GAG GTC AGG ATT TCT CGT TTT CAA ATT GTT TGA GGT CAG GAT TTCTCT-3' (MRE378 is italicized), was cloned into the pGL3-promoter vector (pGL3/3xMRE). The complementary sequence of three copies of the MRE378 was also cloned into the pGL3-promoter plasmid (pGL3/3xMRE-Rev). A fragment containing the perfectly matching sequence with the mature miR-378, 5'-CTA GAA CAC AGG ACC TGG AGT CAG GAG T-3' (the matching sequence of miR-378 is italicized), was cloned into the pGL3-promoter vector (pGL3/c-378). A fragment from +1549 to +1627 of the human CYP2E1 mRNA containing the MRE378 was cloned into the pGL3-promoter vector, resulting in single (pGL3/UTR1) and double (pGL3/2xUTR1) insertion. A fragment +1627 to +1657 excluding the MRE378 was also cloned into the pGL3-promoter vector, resulting in single (pGL3/UTR2) insertion. DNA sequencing analyses using Long-Read Tower DNA sequencer (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ) confirmed the nucleotide sequences of these constructed plasmids.

### 2.3. Cell culture and luciferase assay

Human embryonic kidney cell line HEK293 was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). HEK293

cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) supplemented with 4.5 g/l glucose, 10 mM HEPES, and 10% fetal bovine serum (Invitrogen). These cells were maintained at 37 °C under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>–95% air.

Various luciferase reporter plasmids (pGL3) were transiently transfected with phRL-TK plasmid into the HEK293 cells. Briefly, the day before transfection, the cells were seeded into 24-well plates. After 24 h, 170 ng of pGL3 plasmid, 30 ng of phRL-TK plasmid and the precursors for miR-378 or control were co-transfected using LipofectAMINE 2000. After incubation for 48 h, the cells were lysed with a passive lysis buffer and then the luciferase activity was measured with a luminometer (Wallac, Turku, Finland) using the dual-luciferase reporter assay system.

### 2.4. Establishment of two HEK293 cell lines stably expressing human CYP2E1 including or excluding 3'-UTR

A fragment containing the full-length coding region as well as 3'-UTR of the human CYP2E1 cDNA (from +34 to +1667) was amplified by PCR using the primers of 5'-ATG TCT GCC CTC GGA GTC AC-3' and 5'-AAA ATA ATC ATG TGA TGA TTT ATT TAT ATT CTG GG-3'. A fragment containing only the full-length coding region of the human CYP2E1 cDNA (from +34 to +1516) was also amplified using the primers of 5'-ATG TCT GCC CTC GGA GTC AC-3' and 5'-CTC ATG AGC GGG GAA TGA CA-3'. These fragments were subcloned into the pTARGET vector and the resultants were termed pTARGET/CYP2E1 + UTR and pTARGET/CYP2E1. The nucleotide sequences of the plasmids were confirmed by DNA sequencing analyses. HEK293 cells were seeded into 24-well plates, and 500 ng of pTARGET/CYP2E1 + UTR or pTARGET/CYP2E1 plasmids were transfected using LipofectAMINE 2000 according to the manufacturer's protocols. At 48 h post-transfection, the cells were passaged and subsequently grown in medium containing 400  $\mu$ g/ml G418, and diluted from 1:10 to 1:1000. The selective medium was changed every 3–4 days and individual G418-tolerable colonies were selected after 2 weeks in culture. Tolerable clones were screened by immunoblotting and measurement of enzyme activity. We confirmed that the CYP2E1 protein level and the enzyme activity were sustained regardless of the repeated subculture.

### 2.5. Transfection of precursor for miR-378 into HEK293/2E1 + UTR cells and HEK293/2E1 cells and preparation of cell homogenates and total RNA

The precursor for miR-378 was transfected into the HEK293/2E1 + UTR cells and HEK293/2E1 cells as follows: the day before transfection, the cells were seeded into 6- or 12-well plates. After 24 h, 10 nM precursors for miR-378 or control were transfected into HEK293/2E1 + UTR and HEK293/2E1 cells using LipofectAMINE RNAiMAX. After incubation for 48 h, the cells were harvested and suspended in a small amount of TGE buffer [10 mM Tris–HCl, 20% glycerol, 1 mM EDTA (pH 7.4)] and disrupted by freeze-thawing three times. Total RNA was prepared using RNAiso according to the manufacturer's protocols.

### 2.6. Determination of the half-life of CYP2E1 mRNA

The HEK293/2E1 + UTR cells and HEK293/2E1 cells transfected with the precursor for miR-378 or control as described above were simultaneously treated with 2  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -amanitin. Total RNA was prepared at 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 9 h later. The CYP2E1 mRNA levels were determined by real-time RT-PCR as described below.