

氏 名	朝 居 祐 貴
国 籍 ・ 本 籍	岐阜県
学 位 の 種 別	博士（薬学）
学 位 の 番 号	甲第296号
学位授与の日付	平成30年 3 月20日
学位授与の要件	名城大学学位規程第 3 条第 3 項該当
学 位 論 文 題 目	肝外臓器における薬物代謝酵素の反応速度 論的解析および発現変動に関する研究
論文審査委員	主 査 加 藤 美 紀
	副 査 岡 本 浩 一
	副 査 灘 井 雅 行
	副 査 湯 川 和 典

論 文 内 容 の 要 旨

薬物代謝反応は、その変換様式により第 I 相および第 II 相反応に大別される。第 I 相反応は、Cytochrome P450 (CYP)、アルデヒド脱水素酵素やエステラーゼなどによる、酸化、還元、加水分解反応であり、第 II 相反応は、UDP-glucuronosyltransferase (UGT) や硫酸転移酵素などによる糖や硫酸基の付加反応である。生体内での薬物代謝反応は主に肝臓で行われているが、近年、小腸や腎臓、脳などの肝外臓器にも薬物代謝酵素の発現が認められ、機能していることが明らかにされている。従って、肝外臓器での局所代謝も標的臓器における薬物量に影響を及ぼす可能性がある。しかし、肝外臓器での局所代謝に関する基礎的情報は未だに不足しているのが現状である。

UGT は、多くの薬物や内因性物質のグルクロン酸抱合反応を触媒する最も重要な第 II 相薬物代謝酵素である。グルクロン酸抱合反応は主に肝臓で行われているが、小腸や腎臓などの肝外臓器でも UGT の発現が認められている。そのため、UGT は薬物や内因性物質の局所代謝を担っていると考えられていることから、肝外臓器でのグルクロン酸抱合反応の種差および臓器差を明らかにすることは非常に意義深いと考えられる。さらに近年、UGT は精神疾患や脳神経疾患における薬物治療の標的臓器である脳でも発現しており、脳に作用部位を持つ薬物の脳内薬物量の調節に関与している可能性があるが、脳でのグルクロン酸抱合反応に関する知見はほとんどないのが現状である。肝

臓の UGT の発現は、薬物の投与や疾患により変動することが知られている。従って、薬物の標的臓器である脳にて UGT の発現が変動した場合、脳でのグルクロン酸抱合活性が変化し、薬理効果に影響を及ぼす可能性があるが、未解明な点が多い。そこで本研究では、肝外臓器におけるグルクロン酸抱合反応を速度論的に解析し、さらに、薬物および脳疾患が脳内の薬物代謝酵素の発現に及ぼす影響を解明することを目的とした。

第 1 章では、UGT の代表的な内因性基質である β -エストラジオール (E2) を用い、ヒト、ラット、マウスの小腸および腎臓での E2 17-グルクロン酸抱合反応の速度論的解析を行った。ヒト小腸での E2 17-グルクロン酸抱合反応は Michaelis-Menten 式に適合したが、腎臓では Hill 式に従った。また、E2 17-グルクロン酸抱合反応はヒトでは肝臓のみならず小腸や腎臓でも行われるが、ラットやマウスでは主に肝臓で行われることが明らかとなった。これより、E2 17-グルクロン酸抱合反応には種差および臓器差が存在することを示した。

第 2 章では、肝外臓器の中でも脳に焦点を絞り、ラット脳での常在的な E2 3-グルクロン酸抱合活性を明らかにし、その抱合反応の速度論的解析を行った。ラット小脳における E2 3-グルクロン酸抱合反応は、肝臓と同様に Hill 式に適合したが、これまでに報告されている肝臓での Hill 係数とは異なる値を示した。さらに、Ugt1a1 の阻害薬であるビリルビンによる阻害実験では、肝臓と比較して小脳での阻害作用は弱かった。これより、ラット脳での E2 3-グルクロン酸抱合反応を触媒する主な Ugt1a 分子種は、肝臓とは異なることが示唆されたが、その分子種の同定には至らなかった。

第 3 章では、肝臓の UGT を誘導することが知られている抗てんかん薬カルバマゼピン (CBZ) が、ラット脳 Ugt1a6 および Ugt1a7 の発現に及ぼす影響を検討した。ラットに CBZ を 7 日間連続腹腔内投与した結果、小脳、梨状皮質および海馬にて Ugt1a6 と Ugt1a7 の mRNA 発現が誘導された。さらに、これらの誘導率は、主に Ugt1a6 に触媒されるセロトニングルクロン酸抱合活性の誘導率と相関が認められた。また、CBZ による Ugt1a6 と Ugt1a7 の誘導には、脳部位での constitutive androstane receptor の活性化が関与する可能性を見出した。以上から、CBZ による脳 Ugt1a6 および Ugt1a7 の誘導は、脳を作用部位とする薬物の脳内薬物量および薬理効果に影響を与える可能性が示された。

第 4 章では、世界的に罹患率の高い脳疾患であるてんかんのうち、意識回復のない頻繁な発作を特徴とするてんかん重積状態 (SE) に注目し、SE がラット脳 Ugt1a の発現に及ぼす影響について検討した。併せて、SE 誘発性の Ugt1a の誘導に与える抗てんかん薬ジアゼパム (DZP) の効果について明らかにした。本研究では、カイニン酸をラットに投与することで作成できる SE 動物モデルを使用した。SE は、皮質と海馬の Ugt1a1 と Ugt1a7 を誘導することが示された。また、酸化ストレスマーカーである heme oxygenase-1 mRNA の誘導率もこれら脳部位で高かったことから、SE 誘発性の酸化ストレスによって Ugt1a1 と Ugt1a7 が誘導されたと考えられた。一方、DZP を単回投与する

ことで heme oxygenase-1 mRNA の誘導率は皮質で低下したが、Ugt1a1 は海馬でのみ減少した。これより、SE 誘発性の Ugt1a1 の誘導に及ぼす DZP の影響は、酸化ストレスとは異なる経路を介すると示唆された。SE 誘発性の Ugt1a7 の誘導は、DZP の単回もしくは 14 日間の連続投与でも抑制できなかった。以上より、SE により誘導された脳 Ugt1a の誘導に及ぼす DZP の影響は、脳部位および Ugt1a 分子種により異なることが示された。

脳における局所代謝を考える場合、脳で常在的に高く発現している薬物代謝酵素である CYP2D の存在は考慮すべきである。しかし、SE が脳 CYP2D の発現に及ぼす影響についても明らかにされていない。そこで第 5 章では、SE がラット脳 CYP2D4 の発現に及ぼす影響について検討を行った。CYP2D4 の mRNA 発現量は、SE 誘発性の炎症が生じた皮質と海馬にて低下し、さらには CYP2D により触媒されるデキストロメトルフアン *O*-脱メチル化酵素活性も減少した。核内受容体である octamer transcription factor 1 (Oct-1) は、CYP2D4 の転写開始点上流に存在する応答配列に結合することで、CYP2D4 の転写を活性化する。核内 Oct-1 タンパク質量は、皮質および海馬にて SE による減少が認められた。一方、yin yang-1 (YY1) は、Oct-1 の応答配列への結合を阻害することで CYP2D4 の転写を抑制する。YY1 は、補因子である histone deacetylase 1 (HDAC1) と複合体を形成することで機能するため、YY1 と HDAC1 タンパク質との相互作用を共免疫沈降法にて確認したところ、SE によって皮質および海馬における YY1 と HDAC1 の相互作用が促進された。従って、SE による CYP2D4 の発現抑制は、核内 Oct-1 のタンパク質量が減少し、かつ、Oct-1 の応答配列への結合が YY-1 により阻害されたことで生じた可能性が示唆された。以上より、脳 UGT および CYP2D の発現は、薬物や脳疾患により変動することで、脳に作用部位を持つ薬物の脳内薬物量を局所的に変化させ、薬理効果に影響を及ぼす可能性が示唆された。

本研究で明らかにされた知見は、肝外臓器に発現する薬物代謝酵素が、薬物や内因性物質の局所代謝に影響を及ぼす可能性があることを示す非常に有益な情報を提供するものであると考える。

論文審査の結果の要旨

本申請者の学位論文は、審査の結果、肝外臓器におけるグルクロン酸抱合反応を速度論的に解析し、薬物および脳疾患が脳薬物代謝酵素の発現に与える影響について検討している。1) 肝外臓器における UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) の代表的な内因性基質であるエストラジオール (E2) の 17-グルクロン酸抱合反応の速度論的特徴には、種差および臓器差が存在することを明らかにした。2) ラットにおいて、肝外臓器の一つである脳での E2 3-グルクロン酸抱合反応は、肝臓とは異なる Ugt1a 分子種により触媒されることが示唆された。3) 抗てんかん薬であるカルバマゼピンが、ラットの小脳、梨状皮質および海馬での Ugt1a6 と Ugt1a7 の mRNA 発現量と、主に Ugt1a6 により触媒されるセロトニングルクロン酸抱合活性を増加させることを明らかにした。さらにこの誘導には、脳部位での constitutive androstane receptor の活性化が関与する可能性を見出した。4) てんかん重積状態 (SE) は、ラットの皮質および海馬での Ugt1a1 と Ugt1a7 の mRNA 発現量を増加させることが示された。さらに、SE による Ugt1a1 の増加率は、てんかん治療であるジアゼパム (DZP) を単回もしくは 14 日間の連続投与にて低下した。一方、Ugt1a7 の増加は、DZP の単回および連続投与でも抑制できなかった。以上より、SE により誘導された脳 Ugt1a の誘導に及ぼす DZP の影響は、脳部位および Ugt1a 分子種により異なることが示された。5) SE はラットの皮質および海馬でのシトクロム P450 (CYP) 2D4 の mRNA 発現と、主に CYP2D により触媒されるデキストロメチルファン O-脱メチル化酵素活性をともに減少させることを明らかにした。さらに、SE による CYP2D4 の発現抑制は、核内 octamer transcription factor 1 のタンパク質量が減少し、かつ、octamer transcription factor 1 の応答配列への結合が yin yang-1 により阻害されたことで生じた可能性が示唆された。これより、薬物代謝酵素は肝外臓器で内因性物質や薬物を代謝し、さらには脳の薬物代謝酵素の発現は薬物や脳疾患によって変動されるため、脳に作用部位を持つ薬物の脳内薬物量を変化させる可能性が示された。以上より、学位論文としての条件を備えていると評価できる。従って、学位を授与することを妥当なものと判断する。