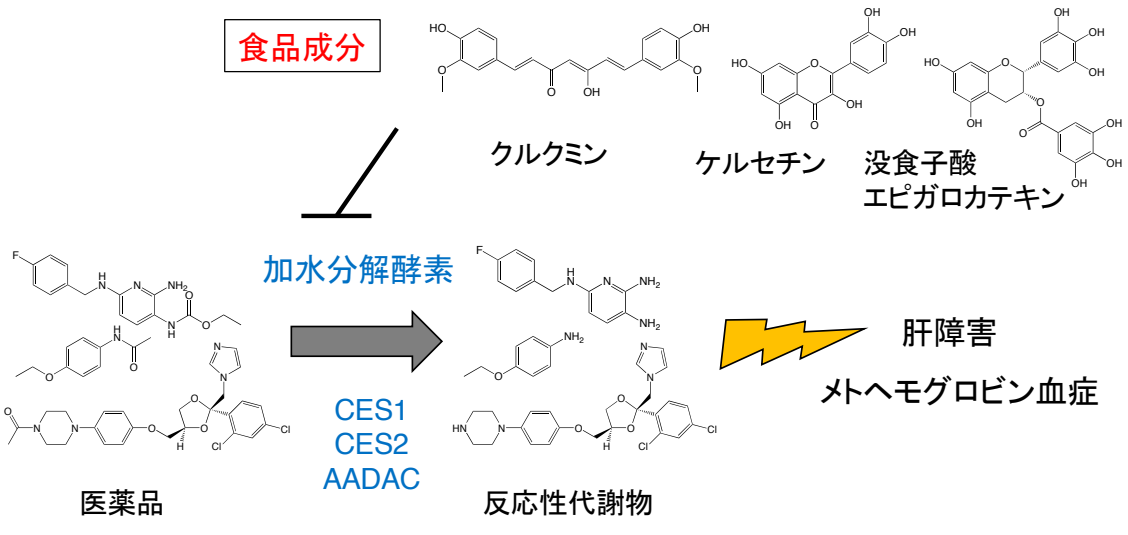
118　食薬相互作用を利用した医薬品副作用の軽減戦略の構築	深見　達基

【目的】医薬品による副作用・毒性発症には肝臓に発現する薬物代謝酵素により生成される反応性代謝物に起因する例が多く、主な薬物代謝酵素であるシトクロム P450 に関する研究に精力が注がれてきた。近年、シトクロム P450 以外の酵素も副作用発現に関与する例が散見され、その阻害特性などの機能解明が課題となっている。シトクロム P450 以外の酵素の中でも加水分解酵素が医薬品の副作用および毒性発症に関与する例が多いことを明らかにしてきた。本研究では、毒性発現の原因となる加水分解酵素を特異的に阻害する化合物を食品成分から見出し、食薬相互作用を利用して、より安全で効果的な薬物治療が可能となるか明らかにすることを目的とした。

【方法】薬物の加水分解反応を触媒することでよく知られるカルボキシルエステラーゼ 1（CES1）、CES2 およびアリルアセタミドデアセチラーゼ（AADAC）が高く発現する薬物代謝の主要臓器、ヒト肝臓のミクロソーム画分におけるフェノフィブラート（CES1 基質）、プロカイン（CES2 基質）およびフェナセチン（AADAC 基質）の加水分解酵素活性に対する 35 種類の食品成分の阻害効果を評価した。強い阻害効果を示した食品成分について、B57BL/6J マウスを用いた *in vivo* 試験および加水分解酵素を発現させた細胞を用いた *in vitro* 試験において、薬物により認められる毒性が抑制されるかどうか解析した。

【結果】ヒト肝臓ミクロソームを用いて 3 種類の加水分解酵素の酵素活性に対する 35 種類の食品成分の阻害効果を解析したところ、クルクミンとケルセチンが全ての加水分解酵素を強力に、エピカテキンや没食子酸エピガロカテキン（EGCg）が AADAC を特異的かつ強力に阻害することを見出した。加水分解酵素の中でも AADAC が特に医薬品毒性の発現に関与する事例が多いため、AADAC に対する EGCg の阻害効果についてマウスを用いて *in vivo* で評価することを試みたが、マウス肝臓ミクロソームにおける Aadac 酵素活性は EGCg により阻害されなかった。食品成分による加水分解酵素への阻害効果には種差が認められる可能性が大きいと考え、食品成分の医薬品毒性に対する抑制効果の検討は細胞を用いた *in vitro* において行った。CES2 を発現させた細胞において解熱鎮痛薬フルピルチンが、AADAC を発現させた細胞において真菌症治療薬ケトコナゾールが細胞毒性を示したが、前者ではケルセチンにより、後者では EGCg により毒性の抑制効果が認められた。さらに、解熱鎮痛薬フェナセチンが AADAC により加水分解されることで認められるメトヘモグロビンの生成は EGCg の存在下において抑制された。このように、食品成分の中に加水分解酵素を強力に阻害し、毒性発現を抑制するものが見出された。このように本研究において、食薬相互作用を利用して、医薬品の副作用発症率を減少できる可能性が示された。

医薬品毒性に関与する加水分解酵素を阻害する食品成分の探索



118. 食薬相互作用を利用した医薬品副作用の軽減戦略の構築

深見　達基

金沢大学 医薬保健研究域 薬学系

Key words：医薬品毒性，加水分解酵素，酵素阻害，食品成分，食薬相互作用

緒　言

臨床における医薬品の副作用発症は、患者の quality of life を考慮すると避けるべき重要な事象である。医薬品による副作用・毒性発現は、用法用量を守らなかった際や多剤併用、すなわち医薬品相互作用により医薬品の血中濃度が薬効血中濃度領域を超えることにより起こることがよく知られている。医薬品相互作用について、薬物代謝酵素の中心的役割を担うシトクロム P450（P450）に関する研究に精力が注がれ、副作用発現を避けるストラテジーが確立されてきた。この他にも肝臓における薬物代謝反応により生成される反応性代謝物により副作用・毒性が発症する事例も存在し、この反応にも P450 以外の薬物代謝酵素（non-P450）が関与する例が散見されるようになってきた。しかし、P450 と比べて non-P450 に関する阻害特性の情報は少なく、副作用回避に向けた化合物を合成することは難しい。

私はこれまで non-P450 の中でも薬物代謝反応を触媒する加水分解酵素に注目し、カルボキシルエステラーゼ（CES）やアリルアセタミドデアセチラーゼ（AADAC）が医薬品の解毒や薬効体の生成に関与するだけでなく、反応性代謝物の生成にも関与することを明らかにしてきた。ヒトにおいて CES には CES1 と CES2 の 2 種類が存在するが、加水分解反応を触媒することにより、CES1 は局所麻酔薬プリロカインやリドカインによるメトヘモグロビン血症に［1］、CES2 は解熱鎮痛薬フルピルチンによる肝障害発現に関与することを明らかにしてきた［2］。また、AADAC は真菌症治療薬ケトコナゾールによる肝障害発現や解熱鎮痛薬フェナセチン（すでに市場から撤退している）によるメトヘモグロビン血症に関与することを明らかにしてきた［3，4］。近年、人々は健康増進を目的として健康機能食品やサプリメントを摂取する。本研究では、食品やサプリメント成分の加水分解酵素に対する阻害効果を明らかにすることにより、医薬品との組み合わせを利用して医薬品副作用を軽減する新しい戦略を構築することを目的とした。

方法および結果

1.　加水分解酵素を阻害する食品成分の探索

CES1、CES2 および AADAC に対して阻害効果を示す食品成分を探索するため、これらの加水分解酵素が発現するヒト肝臓ミクロソームを酵素源として用いて CES1 の特異的基質フェノフィブラート、CES2 の特異的基質プロカイン、および AADAC の特異的基質フェナセチンの加水分解酵素活性に対する 35 種類の食品成分の阻害強度を評価した。検討した食品成分は、アカセチン、アピゲニン、イソラムネチン、（*S*）-エクオール、エピカテキン、エピセサミン、エリオジクチオール、カフェイン、ガランギン、クリシン、クリソエリオール、クルクミン、ゲニステイン、ケルセチン、ケンフェロール、ケンペリド、コーヒー酸、ジオスメチン、シナピン酸、スコポレチン、セサミン、ダイゼイン、タマリキセチン、バニリン酸、フェルラ酸、ヘスペレチン、フィセチン、フラボン、ホモエリオジクチオール、ミリセチン、没食子酸、没食子酸エピガロカテキン、ルテオリン、*cis*-レスベラトロールおよび *trans*-レスベラトロールである。3 種類の加水分解酵素すべてを強力に阻害する成分として、ウコンに含まれるクルクミンと玉ねぎに含まれるケルセチンが見出された。さらに、AADAC に対してのみ強力な阻害作用を示す成分として緑茶に含まれるエピカテキンおよび没食子酸エピガロカテキン（エピガロカテキン 3-ガレート、EGCg）が、CES1 に対してのみ阻害作用を示す成分としてガランギンが見出された（図 1）。今まで AADAC を特異的に阻害する化合物

は見出されておらず、本研究でエピカテキンおよび EGCg を AADAC 特異的阻害化合物として食品成分より初めて明らかにした。

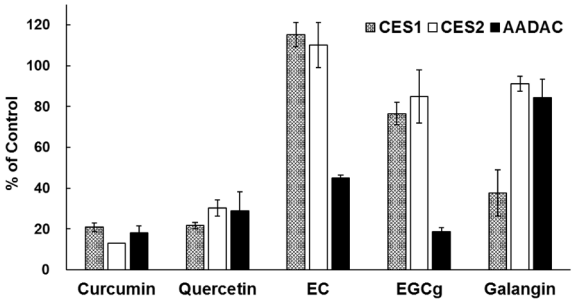


図 1. 代表的な食品成分の CES1, CES2 および AADAC に対する阻害効果

ヒト肝臓ミクロソームにおける CES1（フェノフィブラート加水分解）、CES2（プロカイン加水分解）、および AADAC（フェナセチン加水分解）酵素活性に対する食品成分（100 μM）の阻害効果を評価した。

2. 食品成分の加水分解酵素阻害作用による医薬品毒性軽減効果（*in vivo*）

CES よりも AADAC の方が医薬品副作用および毒性に関与する事例が多いため、EGCg の AADAC 阻害効果を *in vivo* にて解析することを試みた。検討に先立ち、当研究室で作出した *Aadac* ノックアウトマウス（background : C57BL/6J）を用いて、フェナセチンによるメトヘモグロビン血症の発現程度が、野生型マウスと異なるか解析した。その結果、野生型マウスにおいて認められたフェナセチンによるメトヘモグロビン血症が *Aadac* ノックアウトマウスでは認められなかったことから、マウスにおいても Aadac はフェナセチン毒性の決定因子であり、食品成分の阻害検討を行うのに適した動物種であることが示された。しかし、C57BL/6J マウスの肝臓ミクロソームにおけるフェナセチン加水分解酵素活性に対して EGCg は阻害効果を示さなかった。このように、EGCg の AADAC に対する阻害効果には種差が認められたため、さらなる食薬相互作用の解析は *in vivo* ではなく *in vitro* にて進めることにした。

3. 食品成分の加水分解酵素阻害作用による医薬品毒性軽減効果（*in vitro*）

食品成分が加水分解酵素を阻害することにより医薬品毒性を抑制できるか調べるため、以下の検討を行った。

フルピルチンは CES2 により加水分解を受けることで細胞毒性を示す反応性代謝物へ変換される［2］。ヒト肝がん由来細胞 HepG2 細胞にアデノウイルス感染能を利用してヒト CES2 を発現させたのち、150 μM フルピルチンを処置し、細胞毒性を示す lactose dehydrogenase（LDH）の細胞外漏出量を測定した。その際、上記で CES2 を強く阻害することを明らかにしたクルクミンおよびケルセチンをフルピルチンとともに処置した。クルクミン処置では、コントロール細胞である green fluorescence protein（GFP）発現細胞と CES2 発現細胞の LDH 漏出量の差が減少する傾向が認められたが、クルクミンのみでも濃度依存的に LDH 漏出が認められたため、細胞毒性に対する影響を明確に評価することができなかった（図 2a）。一方、ケルセチン処置では、GFP 発現細胞においても LDH 漏出量が上昇することなく、CES2 発現細胞において認められた LDH 漏出量はケルセチン濃度依存的に抑制された（図 2b）。このように、ケルセチンは CES2 を阻害することにより薬物毒性を抑制することが示された。

ケトコナゾールは AADAC により加水分解を受けることで細胞毒性を示す反応性代謝物へ変換される［3］。ヒト肝がん由来細胞 HepaRG 細胞にアデノウイルス感染能を利用してヒト AADAC を発現させたのち、ケトコナゾールを処置し、LDH 漏出量を測定した。その際、上記で AADAC を強く阻害することを明らかにした EGCg を 50 μM ケトコナゾールとともに処置したところ、LDH 漏出量は EGCg 濃度依存的に抑制された（図 3a）。フェナセチンは AADAC により加水分解を受けることでメトヘモグロビン生成に関与する反応性代謝物へ変換される［4］。ヒト肝臓ミクロソームと赤血球を 1 mM フェナセチンとともにインキュベーションし、ヘモグロビンに対するメトヘモグロビンの割合を評価した。その際、EGCg をフェナセチンとともにインキュベートしたところ、メトヘモグロビン生成量は有意に抑制された（図 3b）。このように、EGCg は AADAC を阻害することにより薬物毒性を抑制することが示された。

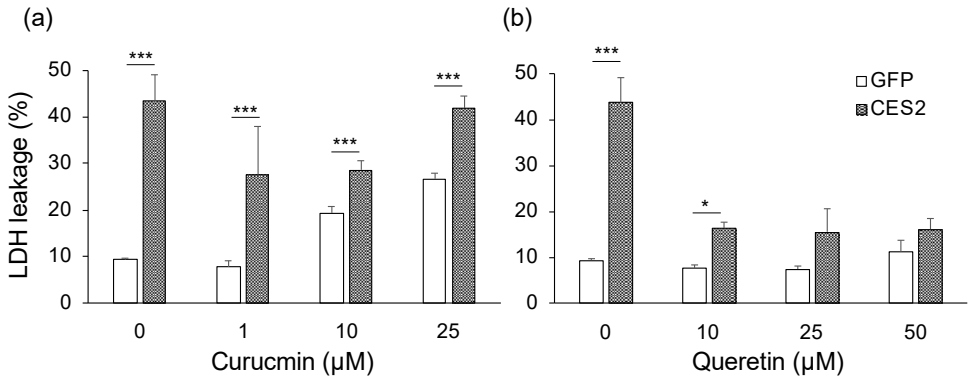


図 2. クルクミンおよびケルセチンの CES2 によるフルピルチン細胞毒性に対する抑制効果

a) CES2 を発現させるアデノウイルスを HepG2 細胞に感染させ、150 μM フルピルチンと 0～25 μM クルクミンを処置し、細胞毒性の指標として LDH の漏出量を評価した。コントロール細胞として HepG2 細胞に GFP を発現させるアデノウイルスを感染させた。Student's *t*-test、$^{***}P < 0.001$。

b) 150 μM フルピルチンと 0～50 μM ケルセチンを処置し、a）と同様の検討を行った。Student's *t*-test、$^{*}P < 0.05$、$^{***}P < 0.001$。

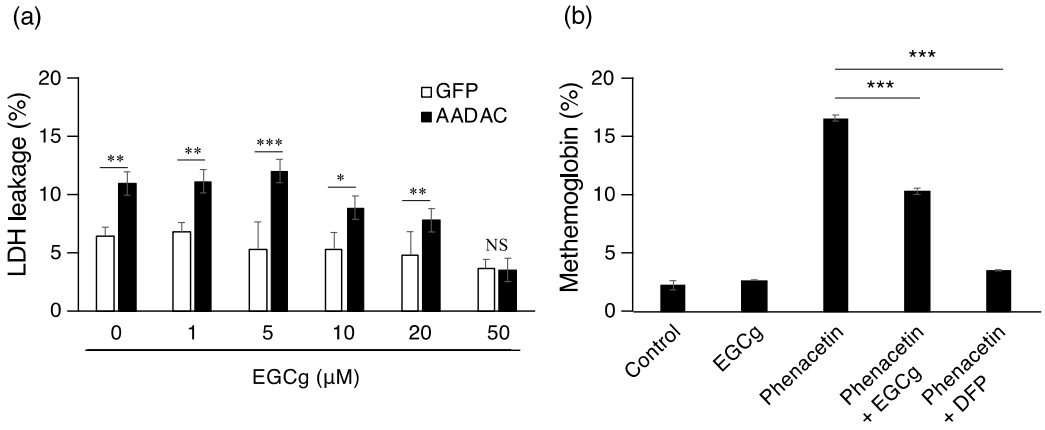


図 3. 没食子酸エピガロカテキン（EGCg）の AADAC によるケトコナゾール細胞毒性およびフェナセチン誘発性メトヘモグロビン生成に対する抑制効果

a) AADAC を発現させるアデノウイルスを HepaRG 細胞に感染させ、50 μM ケトコナゾールと 0～50 μM EGCg を処置し、細胞毒性の指標として LDH の漏出量を評価した。Student's *t*-test、$^{*}P < 0.05$、$^{**}P < 0.01$、$^{*}P < 0.001$。

b) ヒト肝臓ミクロソーム、1 mM フェナセチン、赤血球とともに EGCg をインキュベートし、メトヘモグロビン濃度を評価した。AADAC を阻害する有機リン系化合物 diisopropyl phosphate（DFP）も阻害剤のポジティブコントロールとして用いた。ANOVA、Tukey's post hoc test、$^{***}P < 0.001$。

考　察

本研究において、様々な食品成分の薬物代謝に関与する 3 種の加水分解酵素に対する阻害効果およびそれによる薬物毒性抑制効果を検討した。中でもクルクミン、ケルセチンおよび EGCg といった身近な食品に含まれる成分が加水分解酵素の阻害効果およびそれに基づく薬物毒性抑制効果を示すことが明らかになった。本検討で薬物毒性抑制効果を示した食品成分の濃度は数十μM であり、肝臓中の濃度がこの濃度に達するためにはどの程度の量の食品もしくはサプリメントをどの期間継続して摂取すれば良いのか不明である。加水分解酵素に対する阻害効果に種差が認められたため本検討ではマウスを用いた *in vivo* 検討を行うことができなかったが、今後は検討に適した動物種の探索、もしくはヒトにおける食品成分の肝臓中濃度を予測し、さらなる検討を進めていく必要がある。さらに、強力な阻害効果を示した成分の化学構造を修飾することにより、さらに強力な阻害効果を示す化合物が作出可能か検討を進めることも興味深いと考えられた。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、富山県立大学工学部医薬品工学科バイオ医薬品工学講座の安田佳織講師である。

文　献

1) Higuchi R, Fukami T, Nakajima M, Yokoi T. Prolocaine- and lidocaine-induced methemoglobinemia is caused by human carboxylesterase-, CYP2E1-, and CYP3A4-mediated metabolic activation. Drug Metab Dispos. 2013 Jun;41(6): 1220-1230. Epub 2013 Mar 25. PMID: 23530020 DOI: 10.1124/dmd.113.051714.

2) Konishi K, Fukami T, Ogiso T, Nakajima M. *In vitro* approach to elucidate the relevance of carboxylesterase 2 and *N*-acetyltransferase 2 to flupirtine-induced liver injury. Biochem Pharmacol. 2018 Sep 155:242-251. Epub 2018 Jul 17. PMID: 30028988 DOI: 10.1016/j.bcp.2018.07.019

3) Kobayashi Y, Fukami T, Higuchi R, Nakajima M, Yokoi T. Metabolic activation by human arylacetamide deacetylase, CYP2E1, and CYP1A2 causes phenacetin-induced methemoglobinemia. Biochem Pharmacol. 2012 Nov 1;84(9): 1196-1206. Epub 2012 Aug 23. PMID: 22940574 DOI: 10.1016/j.bcp.2012.08.015.

4) Fukami T, Iida A, Konishi K, Nakajima M. Human arylacetamide deacetylase hydrolyzes ketoconazole to trigger hepatocellular toxicity. Biochem Pharmacol. 2016 Sep 15;116: 153-161. Epub 2016 Jul 12. PMID: 27422753 DOI: 10.1016/j.bcp.2016.07.007