

主論文の要旨

Human UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) 2B10 in Drug *N*-Glucuronidation: Substrate Screening and Comparison with UGT1A3 and UGT1A4

〔ヒト UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 2B10 による薬物 *N*-グルクロン酸抱合:
基質スクリーニングと UGT1A3 および UGT1A4 との比較〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病態医療学講座 化学療法学分野

(指導: 安藤 雄一 教授)

加藤 有紀子

<緒言>

UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) は様々な内因性、外因性化合物にグルクロン酸を付加させる主要な第 2 相薬物代謝酵素である。UGT はスーパーファミリーを形成しており、UGT1A、UGT2A、UGT2B サブファミリーに分類され、ヒトにおいては 19 種の機能的分子種が同定されている。

ヒト UGT2B10 は、主に肝臓に発現するが、1993 年にクローニングされて以来、機能解析はほとんどなされておらず、オーファン UGT と認識されていた。2007 年に新たに UGT2B10 発現系が構築され、ニコチン、コチニンおよびレボメデトミジンの *N*-グルクロン酸抱合反応を触媒することが示された。これらの第 3 級アミン化合物はいずれも、以前まで UGT1A4 によって代謝されると知られており、UGT2B10 の基質特異性が UGT1A4 と類似している可能性が考えられた。しかし、UGT2B10 の基質特異性や生体内における役割は不明な部分が多い。

<目的>

ヒト UGT2B10 の基質特異性および薬物クリアランスにおける重要性を明らかにすること。

<方法>

酵素源には、構築したヒスチジントグ融合 UGT バキュロウイルス発現系 (UGT1A3、UGT1A4 および UGT2B10 発現系) または Corning より購入したプールドヒト肝臓ミクロソーム (HLM) を用いた。

まず、UGT2B10 発現系を用い、14 つのアミン含有薬物の *N*-グルクロン酸抱合酵素活性を LC-MS/MS で測定した。次に、アミトリプチリン、イミプラミンおよびジフェンヒドラミン *N*-グルクロン酸抱合反応について、UGT1A3、UGT1A4 および UGT2B10 発現系と HLM を用いて速度論的解析を行った。最後に、UGT1A4 および UGT2B10 特異的阻害剤としてヘコゲニンおよびニコチンを用い、HLM におけるアミトリプチリン、イミプラミンおよびジフェンヒドラミン *N*-グルクロン酸抱合反応への各分子種の寄与を推定した。

<結果>

UGT2B10 の基質スクリーニング

UGT2B10 の基質特異性を明らかにするため、さまざまな化学構造を有するアミン含有薬物の *N*-グルクロン酸抱合反応について、UGT2B10 触媒活性を検討した (Fig. 1)。第 3 級アミンであるアミトリプチリン、イミプラミン、ケトチフェン、ピゾチフェン、オランザピン、ジフェンヒドラミン、ミダゾラム、タモキシフェンおよびケトコナゾールでは、UGT2B10 触媒活性が認められたが、第 2 級アミン (デジプラミン、ノルトリプチリン) および第 1 級アミン (アフロクアロン、カルバマゼピン) では認められなかった。また、トリフルオペラジンは第 3 級アミンだが、UGT2B10 触媒活性は認め

られなかった。この結果から、UGT2B10 が第 3 級アミンに対して高い基質特異性を示すことが明らかとなった。

UGT 発現系を用いた速度論的解析

アミトリプチリン、イミプラミンおよびジフェンヒドラミン *N*-グルクロン酸抱合反応について、UGT 発現系を用いて速度論的解析を行った (Fig. 2, Table1)。アミトリプチリン、イミプラミンおよびジフェンヒドラミンの *N*-グルクロン酸抱合反応における UGT2B10 の K_m 値はそれぞれ $7.5 \pm 5.1 \mu\text{M}$, $7.2 \pm 5.5 \mu\text{M}$ および $37 \pm 13 \mu\text{M}$ と算出され、UGT1A3 および UGT1A4 と比べて低値を示した。また、UGT2B10 のクリアランス値は UGT1A4 と比べてそれぞれ 12, 57 および 2.9 倍高値を示した。これより、UGT2B10 がこれら薬物の *N*-グルクロン酸抱合反応に対して高い親和性とクリアランスを示すことが明らかとなった。

HLM を用いた速度論的解析

アミトリプチリン、イミプラミンおよびジフェンヒドラミン *N*-グルクロン酸抱合反応について、HLM を用いて速度論的解析を行った (Fig. 3, Table2)。いずれのグルクロン酸抱合反応もミカエリスメンテン式に従った。Eadie-Hofstee プロットは 2 相性を示し、これらの反応を触媒する UGT 分子種は 2 つ以上存在することが示唆された。また、高親和性の K_m 値と低親和性の K_m 値はそれぞれ発現系を用いた速度論的解析における UGT2B10 と UGT1A4 の K_m 値に近似した。

阻害実験

HLM におけるアミトリプチリン、イミプラミンおよびジフェンヒドラミン *N*-グルクロン酸抱合反応に UGT1A4 および UGT2B10 がどの程度寄与しているか調べるため、阻害実験を行った (Fig. 4)。検討には、 $10 \mu\text{M}$ ヘコゲニンおよび $500 \mu\text{M}$ ニコチンをそれぞれ UGT1A4 および UGT2B10 特異的阻害剤として用いた。いずれの薬物においても、低基質濃度の時、ニコチンにより各抱合酵素活性が大きく低下したが、ヘコゲニンによる抱合酵素活性阻害作用はほとんど認められなかった。一方、高基質濃度の時、ヘコゲニンにより各抱合酵素活性が大きく低下したが、ニコチンによる抱合酵素活性阻害作用はほとんど認められなかった。したがって、HLM における各薬物のグルクロン酸抱合反応において、低い基質濃度では UGT2B10 の寄与が大きく、高い基質濃度では UGT1A4 の寄与が大きいことが示唆された。

<考察>

本研究において、ヒト UGT2B10 が第 3 級アミン薬物のアミトリプチリン、イミプラミン、ケトチフェン、ピゾチフェン、オランザピン、ジフェンヒドラミン、タモキシフェン、ケトコナゾールおよびミダゾラムの *N*-グルクロン酸抱合反応を触媒することを明らかにした。UGT1A4 は第 3 級アミンだけでなく、第 1 級アミンおよび第 2 級

アミンの *N*-グルクロン酸抱合反応も触媒する一方、UGT2B10 は第 3 級アミンのみ効率的に抱合する傾向が認められた。しかし、今回検討した第 3 級アミンのうち、トリフルオペラジンは UGT2B10 触媒活性が認められなかった。これより、抱合を受けるアミンの級数だけでなく、側鎖の長さや立体構造等も UGT2B10 触媒活性の規定因子となることが考えられた。

アミトリプチリン、イミプラミンおよびジフェンヒドラミン *N*-グルクロン酸抱合反応において、UGT2B10 の K_m 値は HLM の高親和性 K_m 値と近似し、HLM において UGT2B10 が高親和性酵素であることが示唆された。また、阻害実験により、各薬物濃度が低い場合、HLM において UGT2B10 の寄与が大きいことが示された。アミトリプチリン、イミプラミンおよびジフェンヒドラミンの臨床血中濃度は $0.2 \mu\text{M}$, $0.6 \mu\text{M}$ および $0.2 \mu\text{M}$ と報告されている。本結果より、生体内において UGT2B10 がこれら薬物のグルクロン酸抱合反応の主代謝酵素として働くことが示唆された。

<結論>

UGT2B10 がさまざまな化学構造の第 3 級アミン薬物の *N*-グルクロン酸抱合反応を触媒することを明らかにした。アミトリプチリン、イミプラミンおよびジフェンヒドラミン *N*-グルクロン酸抱合反応において、UGT2B10 が UGT1A4 および UGT1A3 と比べて高い親和性とクリアランスを示し、ヒト肝臓において UGT2B10 が重要な役割を担うことが示唆された。