

平成19年度日本薬物動態学会奨励賞受賞講演

アルドーケト還元酵素の個体差と 遺伝子多型に関する研究



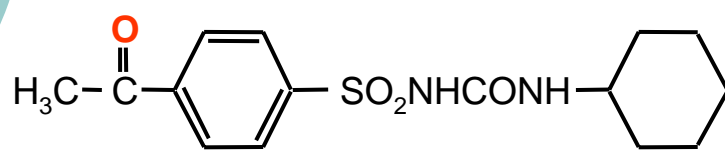
田辺三菱製薬株式会社
薬物動態研究所
久米 俊行

平成19年10月8日

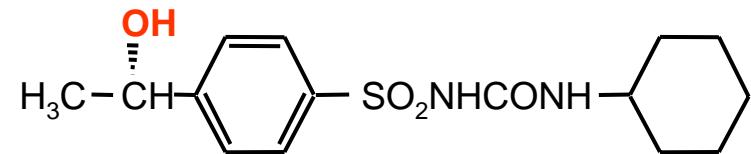


田辺三菱製薬

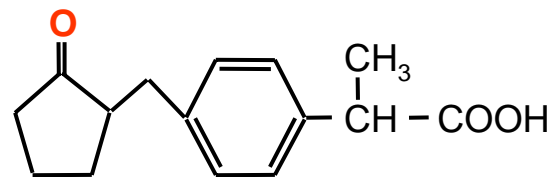
Carbonyl Reduction is Major Metabolic Pathway of Acetohexamide and Loxoprofen in Human



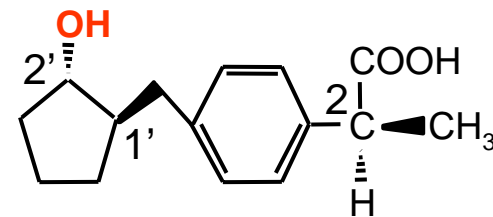
Acetohexamide



S (-) - Hydroxyhexamide



Loxoprofen



(2S, 1'R, 2'S) - *trans*-alcohol

Drug Metabolism Enzymes Responsible for the Reduction of Ketone-containing Drugs in Human Liver

1. Short-chain dehydrogenase reductase (SDR) superfamily :

Carbonyl reductase (CR)

2. **Aldo-keto reductase (AKR) superfamily :**

Aldehyde reductase (ALR)

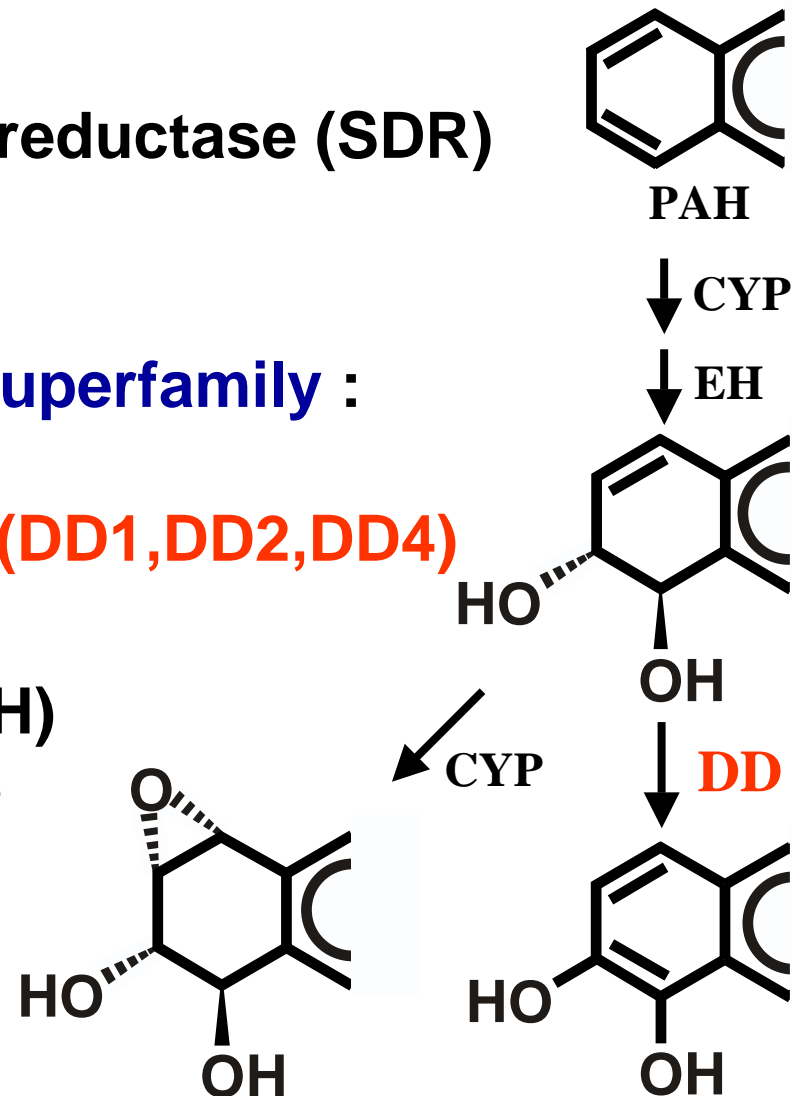
Dihydrodiol dehydrogenase (DD1,DD2,DD4)

3. Others :

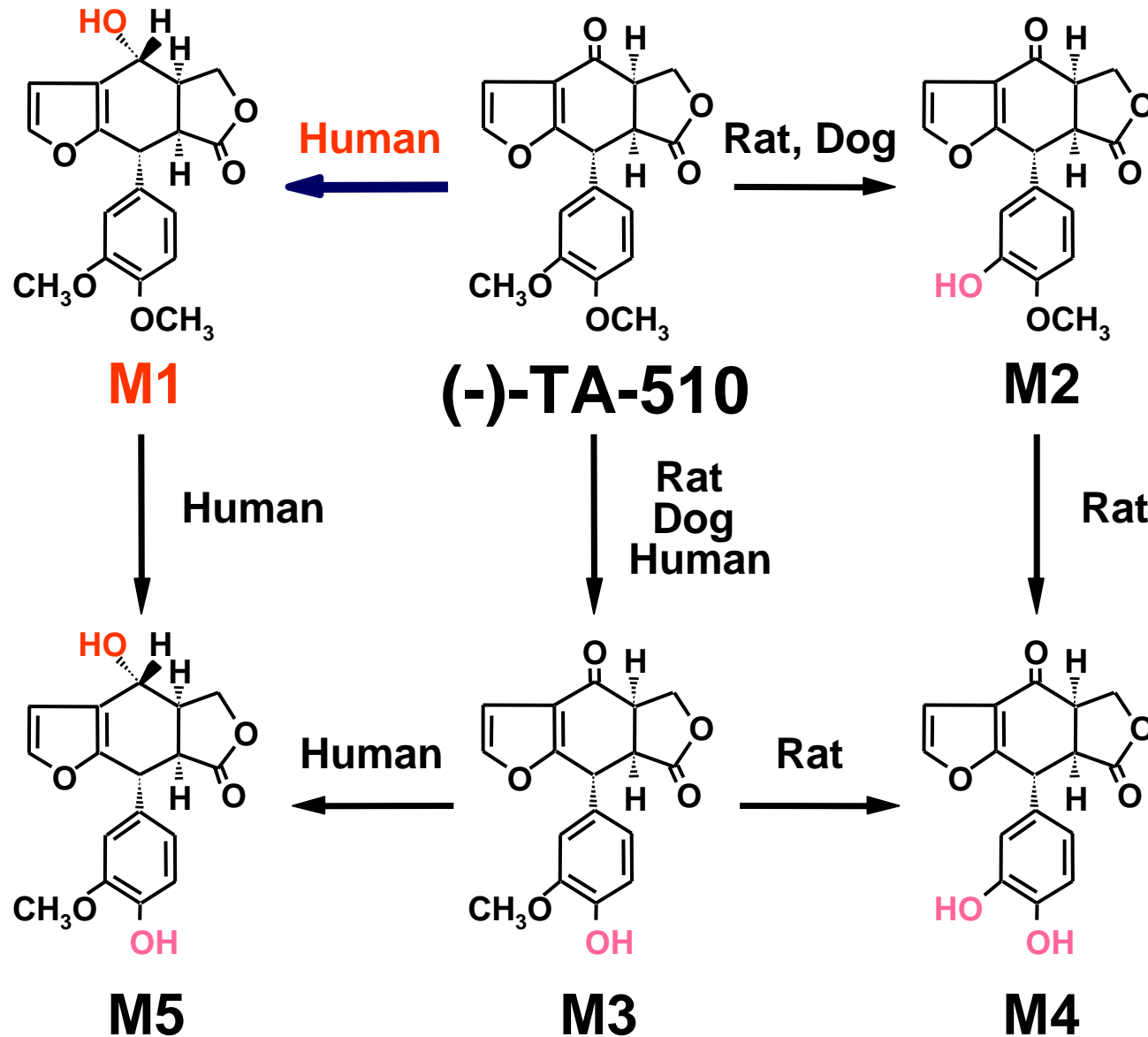
Alcohol dehydrogenase (ADH)

NAD(P)H-Quinone reductase

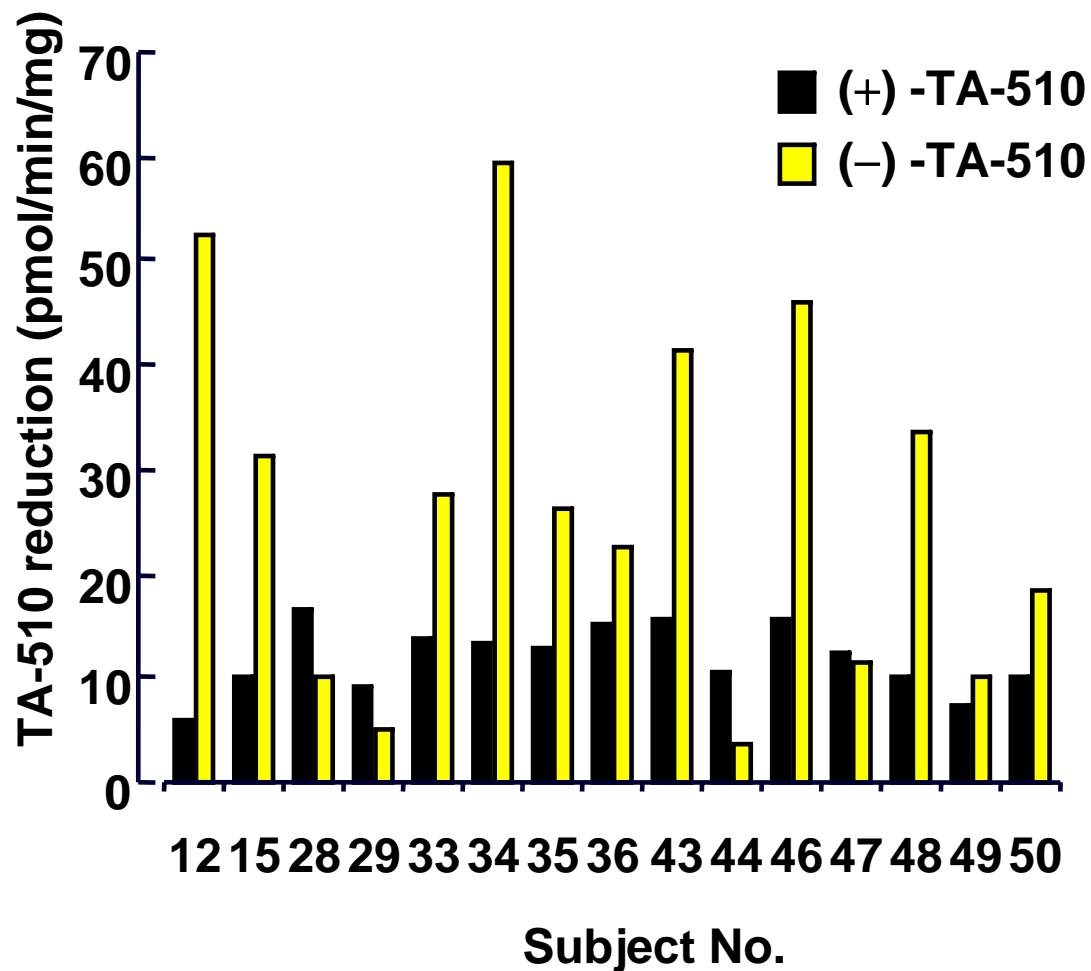
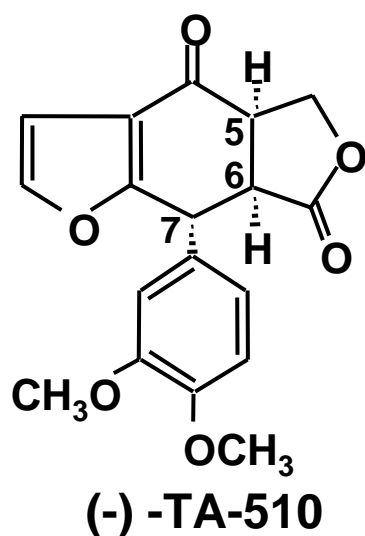
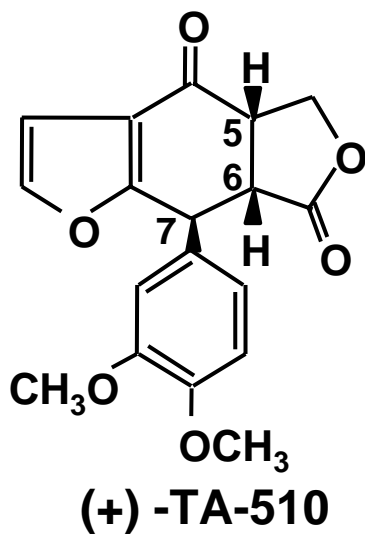
NADPH-P450 reductase



Metabolic Pathways of TA-510, a Hepatic Anti-inflammatory Agent, in Rat, Dog and Human



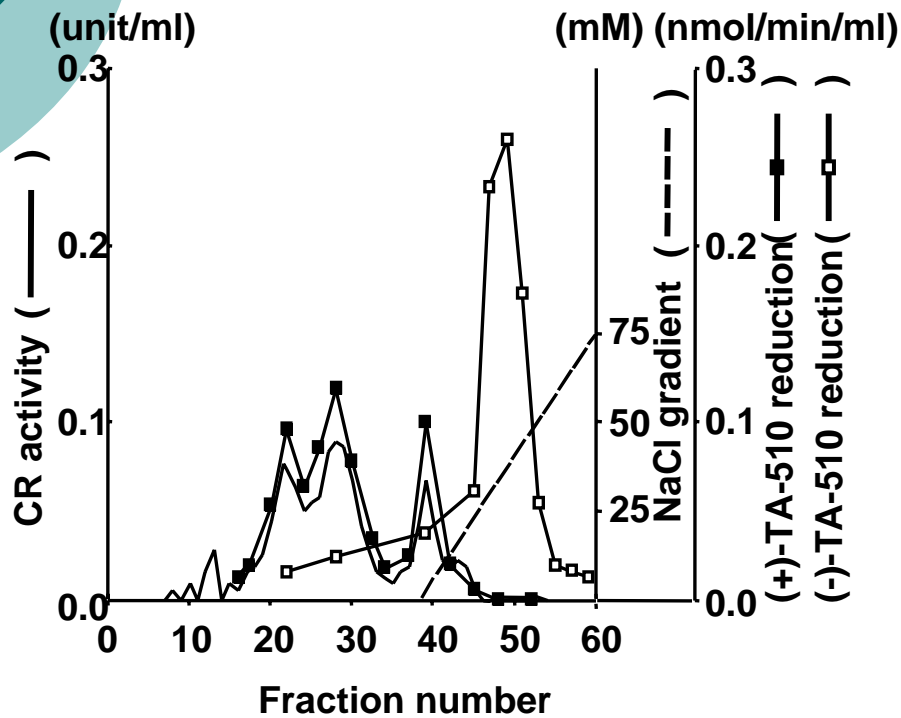
Reductive Metabolism of TA-510 Enantiomers in Human Liver Cytosols (n=15)



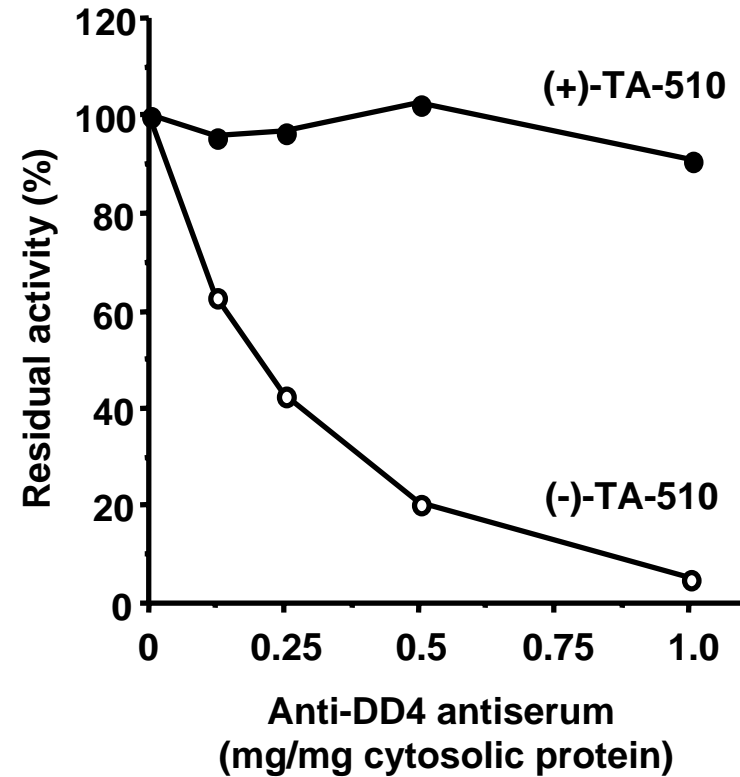
Kume *et al.*, *Drug Metab. Pharmacokinet.*

Identification of TA-510 Reductase in Human Liver Cytosols

DEAE-Sepharose CL-6B column



Immunoinhibition with anti-DD4



Multiple cDNAs for AKR1C1-AKR1C4 Cloned from Human Tissues or Cultured Cells

AKR type	Abbreviation of cDNA	Tissues or cells	Encoded protein
1C1	DD1 cDNA	Liver, colon cells	DD1
	HAKRc	Liver	(not studied) ^a
1C2	DD2 cDNA	Liver	DD2 /bile acid binding protein
	c81	Colon cells	DD2
	Type III	Prostate	DD2 / 3 α -HSD type 3
	MCDR2	Liver	(not studied) ^a
1C3	HAKRd	Liver	(not studied) ^a
	HAKRb	Liver	3 α -HSD type 2
	DBDH cDNA	Myeloid cells	PGD ₂ 11-keto reductase
1C4	3 α (17 β)-HSD cDNA	Prostate	3 α (17 β)-HSD
	DD4 cDNA	Liver	DD4 / 3 α -HSD type 1
	CCDR33	Liver	(not studied) ^a

^a The encoded proteins have not been studied.

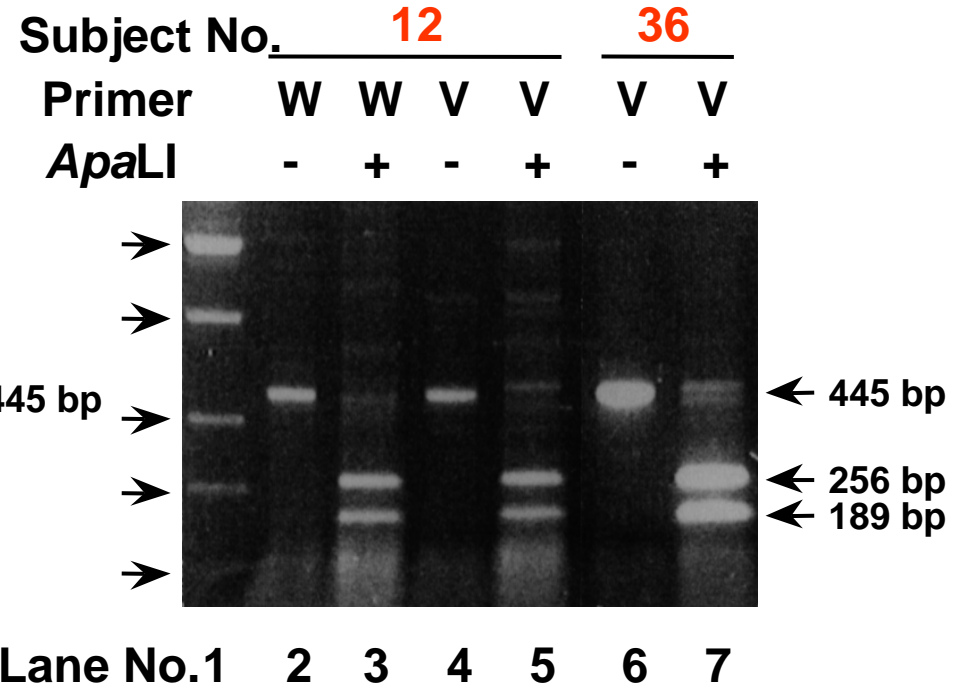
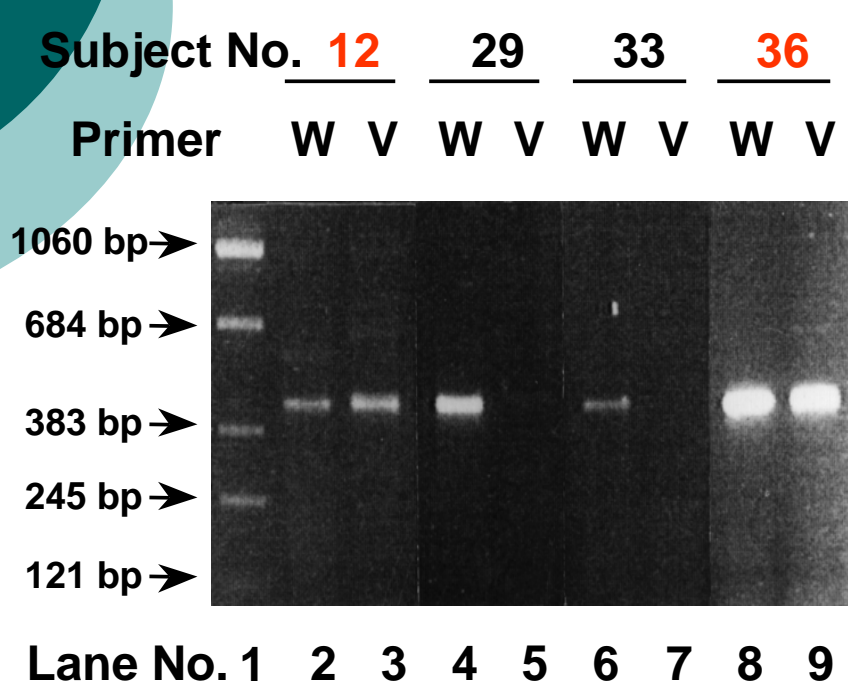
cDNA Sequences of DD4, DD4(S145C/L311V) and CCDR33

DD4 DD4 (S145C/L311V) CCDR33	ATG GAT CCC AAA TAT CAG CGT GTA GAG CTA AAT GAT GGT CAC TTC ATG CCC GTA TTG GGA	60
	Common forward primer	
DD4 DD4 (S145C/L311V) CCDR33	TTT GGC ACC TAT GCA CCT CCA GAG GTT CCG AGG AAC AGA GCT GTA GAG GTC ACC AAA TTA	120
	105 G	
DD4 DD4 (S145C/L311V) CCDR33	GCA ATA GAA GCT GGC TTC CGC CAT ATT GAT TCT GCT TAT TTA TAC AAT AAT GAG GAG CAG	180
DD4 DD4 (S145C/L311V) CCDR33	GTT GGA CTG GCC ATC CGA AGC AAG ATT GCA GAT GGC AGT GTG AAG AGA GAA GAC ATA TTC	240
	ApaI	
DD4 DD4 (S145C/L311V) CCDR33	TAC ACT TCA AAG CTT TGG TGC ACT TTC TTT CAA CCA CAG ATG GTC CAA CCA GCC TTG GAA	300
	261 A	
DD4 DD4 (S145C/L311V) CCDR33	AGC TCA CTG AAA AAA CTT CAA CTG GAC TAT GTT GAC CTC TAT CTT CTT CAT TTC CCA ATG	360
DD4 DD4 (S145C/L311V) CCDR33	GCT CTC AAG CCA GGT GAG ACG CCA CTA CCA AAA GAT GAA AAT GGA AAA GTA ATA TTC GAC	420
DD4 DD4 (S145C/L311V) CCDR33	ACA GTG GAT CTC TCT GCC ACA TGG GAG GTC ATG GAG AAG TGT AAG GAT GCA GGA TTG GCC	480
	434 G (W-AS) Allele-specific reverse primers	⋮
	G (V-AS)	⋮
	[Ser→Cys]	
DD4 DD4 (S145C/L311V) CCDR33	ATC CAG GTT TTT GAA TTC CAG TTG ACA TCA GAG GAT ATG AAA GTT CTA GAT GGT CTA AAC	900
	878 A	
DD4 DD4 (S145C/L311V) CCDR33	AGA AAT TAT CGA TAT GTT GTC ATG GAT TTT CTT ATG GAC CAT CCT GAT TAT CCA TTT TCA	960
	931 G [Leu→Val]	
	*	
DD4 DD4 (S145C/L311V) CCDR33	GAT GAA TAT TAG cat aga ggg tgt tgc acg aca tct agc aga agg ccc tgt gtg tgg atg	1020
	Common reverse primer	

Allele-specific Amplification of DD4 and DD4 (S145C/L311V) cDNA Fragments

A: Allele-specific PCR

B: *Apa*L1 digestion



Lane 1: Size marker

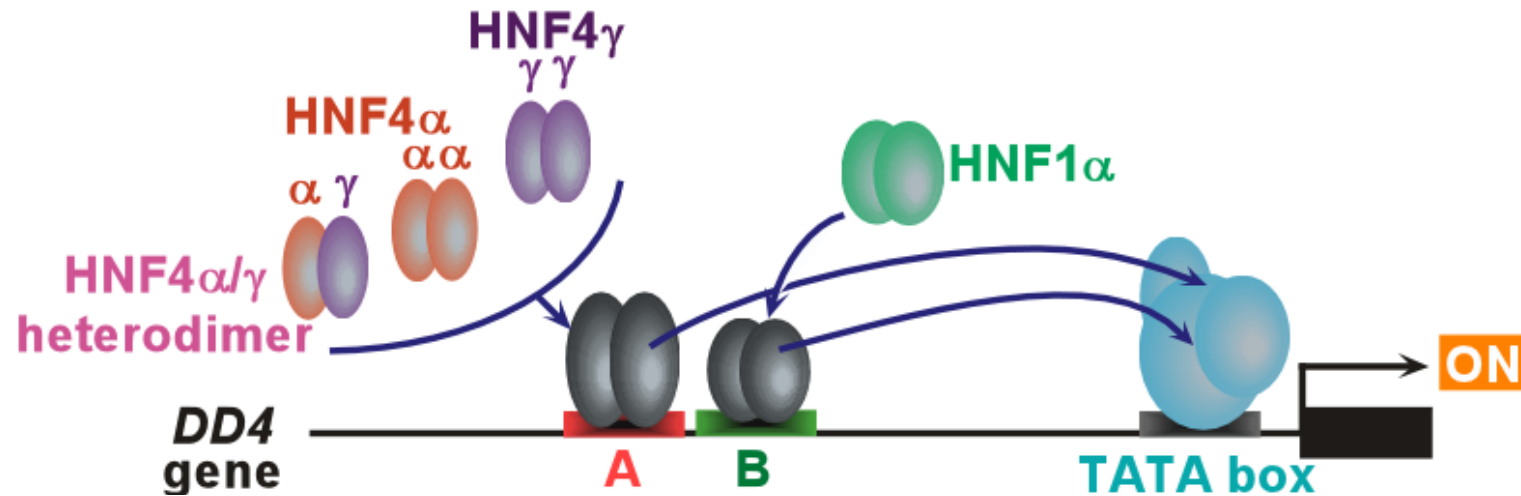
W: W-AS (antisense primer for wild-type DD4)

V : V-AS (antisense primer for variant DD4)

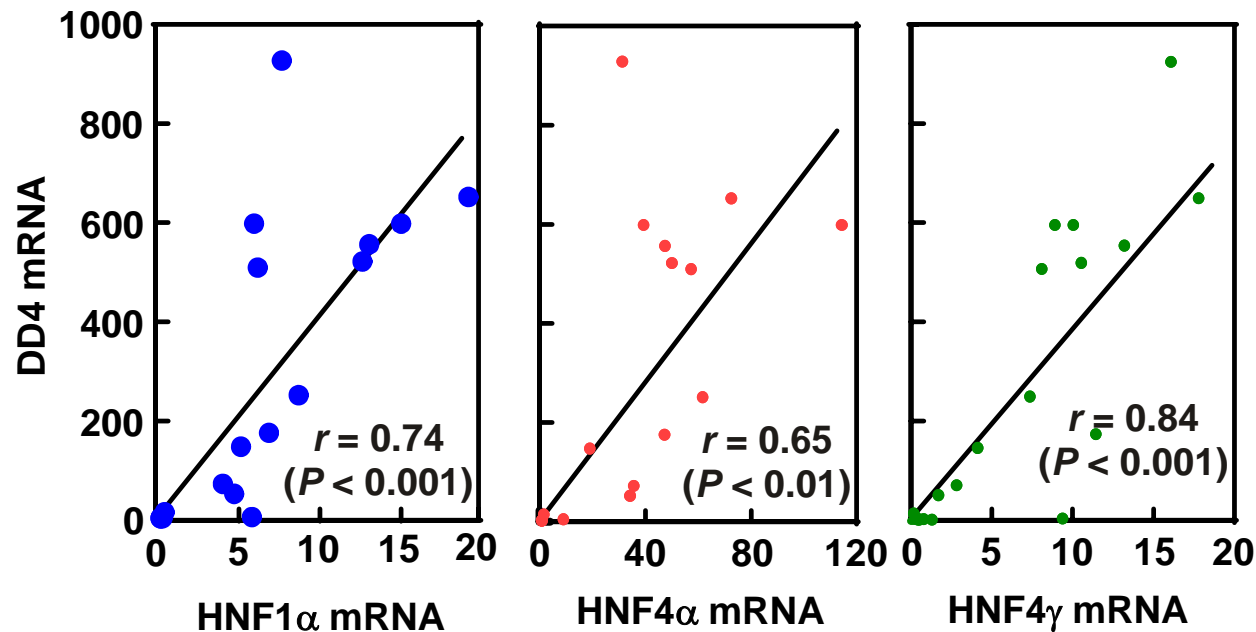
Comparison of Substrate Specificity among DD4, DD4(S145C) and DD4(S145C/L311V)

Substrate	DD4			DD4(S145C)			DD4(S145C/L311V)		
	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	K_{cat} / K_m	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	K_{cat} / K_m	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	K_{cat} / K_m
Oxidation									
(S)-Indan-1-ol	130	7.4	0.06	130	6.5	0.05	250	3.4	0.01
(R)-Indan-1-ol	120	7.3	0.06	140	6.4	0.05	170	1.4	0.008
(S)-Tetralol	62	7.9	0.13	70	7.4	0.11	140	4.0	0.03
(R)-Tetralol	89	7.1	0.08	100	6.8	0.07	240	3.7	0.02
<i>trans</i> -Benzene dihydrodiol	9	0.7	0.08	10	0.6	0.06	17	0.4	0.02
Androsterone	0.5	4.8	9.6	0.4	4.1	10	0.8	2.9	3.6
5 β -Androstane-3 α ,17 β -diol	0.8	6.5	8.1	0.6	7.2	12	1.1	2.7	2.5
Cholic acid	64	14	0.22	59	14	0.23	110	5.3	0.05
Reduction									
Pyridine-3-aldehyde	160	3.6	0.02	170	3.0	0.02	240	1.2	0.005
Naloxone	170	5.3	0.03	130	4.5	0.03	130	1.1	0.008
Naltrexone	120	1.9	0.02	130	1.6	0.01	150	0.6	0.004

Proposed Model for Transcriptional Regulation of Human DD4 Gene



Correlations between Expression Levels of DD4 mRNA and HNF1 α , HNF4 α or HNF4 γ mRNA in Human Livers



Ozeki *et al.*,
Pharmacogenetics

まとめ

本研究では、薬物ケトンである新規肝機能改善薬TA-510の代謝種差に関する研究を発端として、ヒトにおけるアルドール還元酵素(AKR)の個体差と遺伝子多型に関する以下の知見を得た。

- ヒト肝臓における TA-510(-)体の還元反応はAKR1C4(DD4)により触媒されること、また、本酵素活性に約15倍の大きな個体差の存在することが判明した。
- 日本人肝臓を用いたDD4のcDNA クローニングにより、野生型遺伝子と2ヶ所の塩基が異なり、いずれもアミノ酸置換を伴う新規変異体DD4(S145C/L311V)を見出した。
- 日本人137例のゲノムDNAを用いた検討で、この変異体のヘテロ接合体が22例、ホモ接合体が1例観察された。
- 日本人の肝臓40検体を用い、AKRファミリーに属する4分子種の遺伝子多型を調査した結果、DD4(S145C/L311V)のみが唯一かつ機能的変化を伴う変異体であることが明らかとなった。
- 野生型と変異型の組換え発現酵素の触媒活性を比較検討した結果、変異型酵素では薬物ケトンの還元活性や内因性基質であるステロイド類の代謝活性が1/3~1/5に低下していた。
- AKR1C4(DD4)の発現は、HNF1 α 、HNF4 α およびHNF4 γ により正の調節を受けること、および、これら転写因子の発現量変動がアルドール還元酵素の個体差のもう一つの要因であることが明らかとなった。



謝辞

北海道大学名誉教授
岐阜薬科大学教授
金沢大学教授

鎌滝 哲也 先生
原 明 先生
横井 毅 先生

北海道大学関係者：
大関 健志 博士
高橋 芳樹 博士
中山 佳都夫 博士
他 研究室の皆さん

岐阜薬科大学関係者：
白石 弘章 博士
松浦 一也 博士
出屋敷 喜宏 博士
他 研究室の皆さん

田辺三菱製薬関係者：
大塚 峯三 博士, 先輩・同僚の皆さん