レクチャーノートも今号で三回目の掲載となります．皆さんの情報源として少しはお役に立ちますでしょうか?

ニュースレター編集委員会では，皆さんからご感想やご意見あるいは内容に関する質問をお受けいたしております．今号の統計質問箱において取り上げた内容は，某研究室からの質問を基に作成しております．その他のレクチャーノートに関しましても是非 DMPK 誌編集部(dmpk-ed@ps.toyaku.ac.jp)あるいはニュースレター編集委員(玉井 tamai@rs.noda.tus.ac.jp)までご要望などをお寄せ下さい．

さて，現在 6 テーマでレクチャーノートを進行させていますが，今回から新たに京都大学山下富義先生に「In silico 薬物動態予測の実現に向けて」と題したレクチャーノートを企画していただきました．あふれる情報をどのように体内動態予測・評価に利用するか，今後のキーとなるテーマです．また，今後は「ブリッジング」，さらに多くの情報が蓄積しつつある「薬物代謝酵素」の 2 テーマに関する企画を開始する予定です．いずれも各分野の第一人者の方にご執筆いただきます．どうぞご期待下さい．

そのほかにも皆さんのご希望のテーマがありましたら是非お知らせ下さい．心よりお待ちいたしております．

レクチャーノート：代謝酵素とトランスポーターの機能協関による異物解毒(3)

カルボキシルエステラーゼの構造と機能

熊本大学大学院医学薬学研究部
今井輝子

生体に取り込まれた異物を排除する生体防御機構の役割を担っているのは，酵素およびトランスポーターであり，両者が協奏的に働く時，最も効率よく機能する．前回述べられた抱合酵素は，輸送体が異物として認識できるタグを分子に付与する役目を果たしていると考えられ，タグ(例えば，グルクロン酸)を異物に付与することによって，生体は異物を速やかに認識して体外に排除する．抱合酵素と同様に小胞体膜に存在する酵素にカルボキシルエステラーゼがある．カルボキシルエステラーゼ(CES)は，字のごとくカルボン酸のエステルを加水分解する酵素として同定された．この酵素は抱合酵素のように糖や硫酸基のようなタグを異物に付与するわけではないが，CES によって加水分解された異物の分子末端にはカルボキシル基や水酸基が出現するため，これによって輸送担体や抱合酵素が異物を認識できるようになると考えられる．また，本酵素はプロドラッグの活性化において主要な役割を果たしている．今回はカルボキシルエステラーゼの構造および分子多様性，臓器特異性について紹介する．

1)カルボキシルエステラーゼ(CES)とは?

CES は EC3.1.1.1 の番号がつけられた加水分解酵素であり，カルボン酸エステル以外にもアミド結合やチオエステル結合を加水分解するため，多くの医薬品，農薬，環境化学物質等の異物解毒に関与する[1]．CES は活性中心にセリン残基を有する典型的な加水分解酵素であり，セリン残基にアシル基が結合したアシル-酵素中間体を形成し，最初の生成物(R-OH, R-NH_2, R-SH)が脱離した後，第 2 の基質である H_2O にアシル基を転位する典型的なピンポン bi-bi (バイバイ)機構で加水分解を触媒する．CES は生体のほとんどの臓器に発現しているが，CES の C 末端は小胞体内腔側の retention　signal である HXEL 配列を有しており，C 末端が KDEL 受容体に結合して，CES 分子は小胞体内腔側にぶら下がった状態で存在する．そのため，基質は小胞体膜を透過した後，内腔側で加水分解されることになる．

CES の nomenclature に関して，現時点では統一されておらず，同一の CES に複数の名前がつけられている状態であるが，本稿においては，細川等による命名に従う．表 1 に示すように，アミノ酸の一次構造に基づく分子進化の系統樹から，CES は 4 つのファミリーに分類される[1]．この中で薬物代謝に関与するファミリーは，主として CES1 と CES2 ファミリーである．CES1 に関しては，さらに，1A から 1C の 3 つのサブファミリーに分けられる．CES1A は肝臓をはじめ多くの臓器に分布しており，哺乳動物種間で高度に保存されている．CES1B サブファミリーは生体内基質である長鎖アシル CoA の加水分解を触媒する特徴がある．さらに，CES1C サブファミリーは肝臓で合成されるが，C 末端に HXEL 配列を持たないため血中に分泌される．CES1C 酵素はラット，マウスに発現するが[2]，サルやヒトには存在しないため，血漿中の加水分解活性に大きな種差が存在する[3]．

CES　isozyme の基質特異性の相違により，臓器差，種差が存在するが，いずれの動物種においても，蛋白あたりの CES の加水分解活性は肝臓において最も高く，小腸上皮細胞[4]や腎臓[5]においても比較的高い活性を示す．図 1 に肝臓における加水分解の種差を示す[6]．エステル型基質として *p*-Nitrophenylacetate および Malathion，アミド型基質として Butanilicaine および Isocaboxazid が用いられているが，いずれの場合も著しい種差が認められ，用いた基質により種差が見られた．このような著しい種差の原因として，肝臓には CES1 ファミリー以外にも CES2 ファミリーが存在すること，また，ヒト肝臓では主に単一の CES1 ファミ

リー酵素が活性を担っているが，ラットでは3種のCES1ファミリー酵素が基質に応じて異なる触媒活性を示す可能性がある，など動物種によって加水分解に寄与するCES isozymeは質的にも量的にも異なるためと考えられる．
一方，CES2ファミリーは常在的に小腸に発現し，経口投与後のエステル含有化合物の加水分解に重要な役割を果たしている[4]．しかしながら，非臨床試験で用いられるビーグル犬の小腸にはCESが存在しないため，ビーグル犬を用いた経口投与実験からヒトの体内動態を予測することは非常に危険である．

表1　哺乳動物に発現しているCESの分類

アイソザム	分子量	HU1との相同性(%)[1)]	発現臓器
CES1A	58,000～62,000（3量体／単量体）	75～100	肝，脳，肺，腎，マクロファージ
CES1B	58,000～64,000（単量体）	63～70	肝，腎
CES1C	70,000～80,000（3量体／単量体）	65～70	血漿(分泌型)
CES2	58,000～60,000（単量体）	40～50	小腸，肝
CES3	59,000(単量体?)	～40	肝
CES4	46,500(単量体?)	～30	小腸，肝

1)ヒトCES1A酵素のHU1のアミノ酸配列を100%とした時の相同性

2)CESの構造

最近，ウサギ肝のCES1ファミリーに属する酵素のX-線結晶構造が明らかにされ，CESは3つのドメイン，すなわち触媒ドメイン，$\alpha\beta$ドメインおよび制御ドメインから構成されることが示された[7)]．触媒ドメインは14本のβストランドからなる逆平行βシートの周囲に8本のαヘリックスが配位した，典型的なα/β Hydrolase foldを形成しており，最も大きなドメインである．制御ドメインはC末端のヘリックスを含む5本のαヘリックスから成り立っている．また，$\alpha\beta$ドメインは3本のαヘリックスと4本のβストランドから構成され，触媒ドメインと制御ドメインの両者に隣接する．触媒ドメインと$\alpha\beta$ドメインには各々1つずつジスルフィド結合があり，CESの立体構造を安定化させている．また，触媒ドメインには活性中心である触媒トライアードを形成するSer_{221}，Glu_{353}，His_{467}が存在する．反応性Ser残基がアシル基を結合するためには，まず，Ser残基のプロトンが解離して，活性化される必要があるが，このプロトンを受け取る塩基としてHisが存在し，さらにHisを安定化する酸性残基としてGluが存在する．このようなアミノ酸3残基から構成される活性部位を触媒トライアードと呼ぶ．図2に示すように，反応性Ser_{221}はαヘリックスの頭部に固定され，活性中心の深部に位置するが，Glu_{353}およびHis_{467}はflexibilityのあるループの近傍に存在して，基質が酵素に結合すると，活性中心側にループが移動して触媒トライアードを形成することが示された．また，基質結合部位は，活性中心を挟んで「上あご」と「下あご」のよ

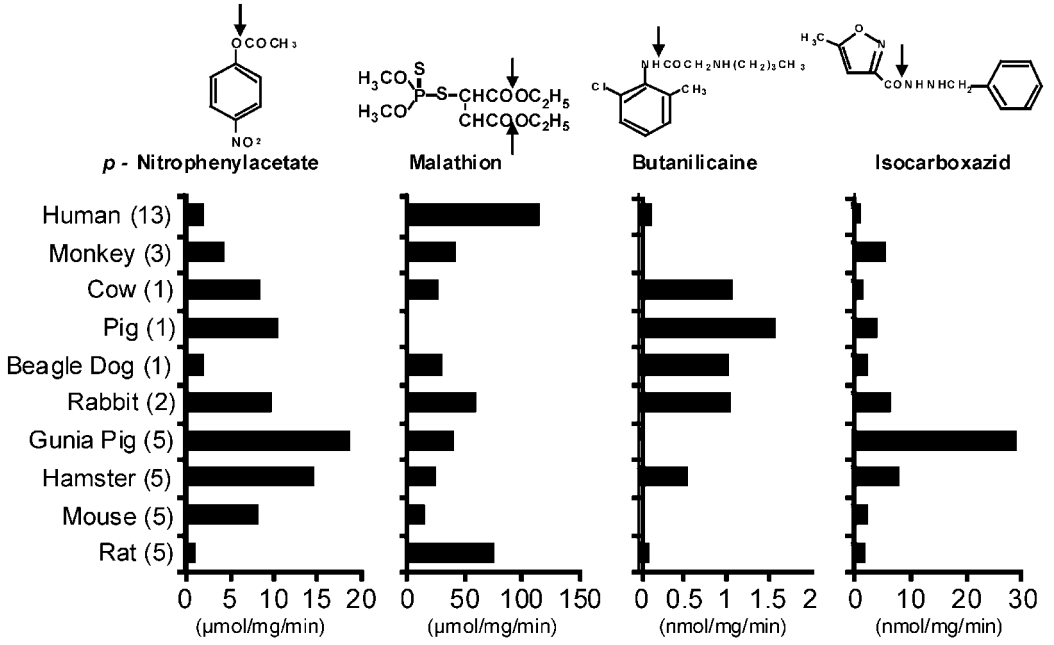

図1.　ヒトおよび哺乳動物の肝臓ミクロソームにおけるカルボキシルエステラーゼ活性の比較
()内の数字は使用したヒトまたは実験動物の個体数を表している．文献6)より引用

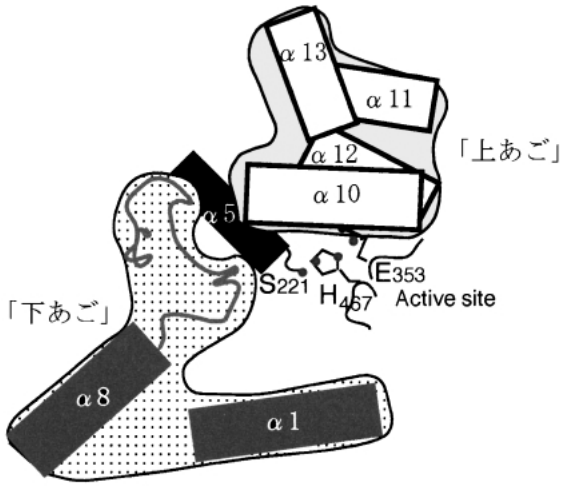

図2.　ウサギ肝CESの活性部位および基質結合部位の模式図
文献7)より改編.
活性部位としての触媒トライアードはSer221, His467, E353から構成される.「上あご」と「下あご」は基質結合部位を表す.

うな構造であることが報告された．さらに，　CESはN–結合型の糖鎖を有する糖タンパクであるが，ウサギ肝CESには糖鎖結合部位が2箇所(Asn_{79}, Asn_{389})存在する．Asn_{389}はCPT11の加水分解において，最初の加水分解産物である4-piperidino-piperidineを酵素から脱離するためのゲートとして機能する可能性が示された．ヒトCES1ファミリーに属する酵素のHU1(別名；hCE1)には，Asn_{79}に相当する結合部位は存在するが，Asn_{389}に相当する部位はない．一方，ヒトCES2酵素のHU3(別名；hiCE)にはAsn_{389}に相当する部位として，Asn_{267}があり，CPT11がHU1よりもHU3によって加水分解されやすい事実[8]は，糖鎖結合がCESの加水分解活性に影響を及ぼす可能性を示唆している．
基質結合部位に相当するアミノ酸配列を，ウサギ肝CESと同じCES1ファミリーに属する酵素のHU1，およびCES2ファミリーのHU3で比較してみると，「上あご」を形成している4本のαヘリックス(α10～α13)は，HU1が80%の相同性を示すのに対し，HU3は26%の相同性しかない．「下あご」の部分(α1，α8，β15とα8の間のループ)に関しては，HU1が64%の相同性であり，HU3にはループ構造が欠損することに加え，19%の相同性しか得られていない．触媒トライアードのような活性部位近傍のアミノ酸配列は，種々のisozyme間で高度に保存されているが，基質結合部位については相同性が低く，CES　isozymeの基質特異性の原因であると考えられる．しかしながら，ウサギ肝CESの基質結合部位との相同性が低いHU3において，CPT11が加水分解されやすいことを考えあわせると，基質結合部位だけでなく糖鎖結合など多くの因子によって，基質特異性が決定されるものと考えられる．

3)CESによる加水分解の基質特異性[9]

一般的に，経口投与後のエステル含有化合物の体内動態を理解する上では，まず，小腸と肝臓での加水分解を知る必要がある．そこで，ヒト小腸および肝臓の加水分解をPropranolol，Flurbiprofenのプロドラッグおよび ACE 阻害剤であるTemocaprilを用いて検討した．その結果，図3に示すように，Flurbiprofenプロドラッグは小腸ではほとんど加水分解されず，肝臓において，R体選択的な加水分解を受けた．図には示していないが，Temocaprilにおいても同様な結果が得られた．一方，Propranololプロドラッグは肝臓でも小腸でも加水分解され，肝臓においてはR体優先的な加水分解が認められた．また，細川等によって作製されたHU1およびHU3の哺乳動物細胞発現系[10]を用いて，基質特異性を調べたところ，肝臓および小腸の加水分解活性はそれぞれ，HU1，HU3の活性に類似しており，ヒト肝ではHU1，ヒト小腸ではHU3が薬物代謝における主要なアイソザイムであることが明らかとなった．
基質特異性については，肝臓CES HU1が比較的広い基質特異性を示すのに対し，CES HU3はTemocaprilやFlurbiprofenプロドラッグのように，アシル基の大きい化合物を基質にし難い特性を持つものと推測された．また，CES HU3に比べて，HU1の方が基質の立体配座を良く認識しており，Propranololと Flurbiprofenの両プロドラッグに関して，R体優先的な加水分解を触媒した．さらに，CES HU1と HU3の*p*–アミノ安息香酸エステル類および*p*–ヒドロキシ安息香酸エステル類の加水分解に及ぼすエステル鎖長を検討したところ，HU1はエステル鎖長の長さに依存して活性が低下したのに対し，HU3は鎖長に従って活性が増大するという全く逆の基質特異性を示した．
このように，CESはisozymeによって基質特異性が異なっており，今後，CESの構造と基質特異性の関連性が明らかにされることによって，基質特異性を利用したエステル含有医薬品の設計が可能になると考えられる．

4)CES–トランスポーター連関[11]

CESとトランスポーターの協奏的作用に関する例について，最近，我々が得た知見を紹介する．Fluphenazineは P–糖タンパク質の基質として知られている化合物であり，エナンチル誘導体およびデカン酸誘導体が臨床応用されている．我々はFluphenazineに種々の脂肪酸を結合させた誘導体を合成し，その細胞内動態を検討した．その結果，Fluphenazineの脂肪酸誘導体は P–糖タンパク質の基質となりにくく，CESによって加水分解を受けてFluphenazineに変換したのちに，P–糖タンパク質によって細胞外に排出

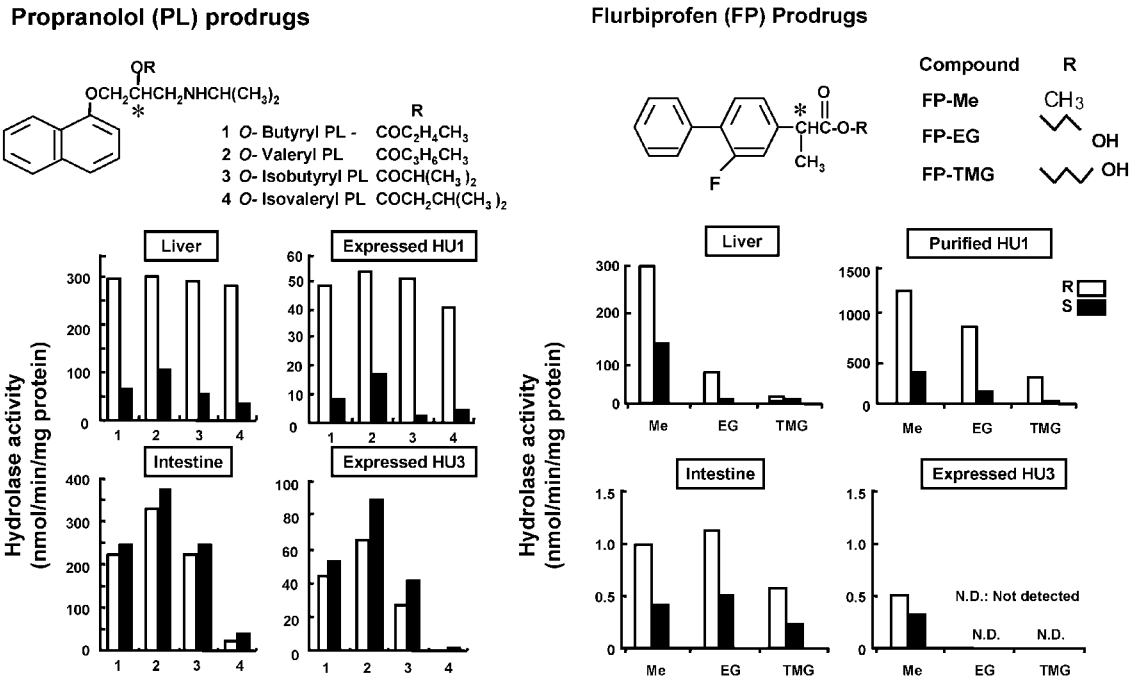

図 3. Propranolol 及び Flurbiprofen プロドラッグの小腸及び肝臓における加水分解と CES HU1，HU3 の加水分解活性の比較
CES HU1 および CES HU3 は V79 細胞に安定発現させ，そのホモジネートを用いた．

されることを見い出した．Fluphenazine 誘導体は HU1 のみならず HU3 によっても加水分解され，また，脳毛細血管内皮細胞に特異的に発現する hBr3(CES1 ファミリー)によっても加水分解を受けることを明らかにした．血液脳関門を形成するヒト脳毛細血管内皮細胞には，HU1 を初め hBr3 など少なくとも 3 種以上の CES が存在することが明らかにされており[10]，Fluphenazine 誘導体は脳において毛細血管内皮細胞に移行した後，内皮細胞内で加水分解を受け，その後 P–糖タンパク質によって排出されるものと考えられる．ヒト脳毛細血管内皮細胞における P–糖タンパク質の発現は明らかではないが，アストロサイトへの移行は P–糖タンパク質によって制御されているものと推測される．同様の CES-Pgp 連関は小腸上皮細胞でも起こることを Caco-2 細胞において明らかにした．

代謝酵素および輸送担体はほとんどの臓器に発現することから，代謝酵素–トランスポーター連関は異物の排除システムとしてだけでなく，生体が必要とする成分を効率良く移行させるためのシステムとして，生命の進化過程で備わった機能であり，物質の組織移行性をコントロールしているものと考えられる．

文献

1) Satoh T, Hosokawa M., The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1998; 38: 257–88.

2) Van Lith HA, Haller M, Van Hoof IJ, Van Der Wouw MJ, Van Zutphen BF, Beynen AC., Characterization of rat plasma esterase ES-1A concerning its molecular and catalytic properties. Arch Biochem Biophys. 1993; 301: 265–74.

3) Welch RM, Brown A, Ravitch J, Dahl R., The in vitro degradation of cisatracurium, the R, cis-R'-isomer of atracurium, in human and rat plasma. Clin Pharmacol Ther. 1995; 58: 132–42.

4) Zhang W, Xu G, McLeod HL., Comprehensive evaluation of carboxylesterase-2 expression in normal human tissues using tissue array analysis. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2002; 10: 374–80.

5) Dean RA, Zhang J, Brzezinski MR, Bosron WF., Tissue distribution of cocaine methyl esterase and ethyl transferase activities: correlation with carboxylesterase protein. J Pharmacol Exp Ther. 1995; 275:965–71.

6) 細川正清，千葉寛，カルボキシルエステラーゼの分子多様性．「薬物バイオアベイラビリティ評価と改善の科学」杉山雄一編，現代医療社，東京，PP201–208.

7) Bencharit S, Morton CL, Howard-Williams EL, Danks MK, Potter PM, Redinbo MR., Structural insights into CPT1-1 activation by mammalian carboxylesterases. Nat Struct Biol. 2002; 9: 337–42.

8） Humerickhouse R, Lohrbach K, Li L, Bosron WF, Dolan ME., Characterization of CPT-11 hydrolysis by human liver carboxylesterase isoforms hCE-1 and hCE-2. Cancer Res. 2000; 60: 1189–92.
9） 細川正清，今井輝子，カルボキシルエステラーゼの分子多様性とプロドラッグの代謝活性化．ファルマシア 2001; 37: 119–123.
10） Mori M, Hosokawa M, Ogasawara Y, Tsukada E, Chiba K., cDNA cloning, characterization and stable expression of novel human brain carboxylesterase. FEBS Lett. 1999; 458: 17–22.
11） 今井輝子，芦刈裕美，森美恵子，小笠原裕子，細川正清，千葉寛，ヒト脳カルボキシルエステラーゼの機能解析，薬物動態，2001: 16; S233.

レクチャーノート：薬物相互作用－臨床現場からの提言：薬物動態学の臨床現場への展開のために(3)

～詳細な薬物動態解析，全体と組織～

国立循環器病センター薬剤部　上野和行

今回は最初に興味ある症例を提示して，その後薬物動態研究，相互作用について考えてみる．

＜症例 1＞肝血流が止まった．

重篤な心室頻拍により薬物クリアランス(メキシレチン)が激減した症例である．抗不整脈薬メキシレチンは肝代謝型薬物で主としてCYP2D6，CYP1A2 で代謝され比較的個体間変動も小さく，また線形性の高い薬物である．本症例は重篤な心室頻拍により，肝臓の逸脱酵素 GOT（AST），GPT（ALT）が約 2 日で 1 万 u 近くまで上昇した．同時にメキシレチンクリアランスが10%以下にまで激減した．しかし 3，4 日の非常に短期間での逸脱酵素の正常化に伴いメキシレチンクリアランスも 3，4 日間で元の状態に戻った．そこで，本症例を考えてみることにした．本症例は重篤な心室頻拍によりいわば心臓が空打ち状態になり，心臓からの血流量が極端に減少したと考えられる．しかし脳など生命維持に瞬時の休養も許されない臓器には血流の維持が保たれる(事実本患者は脳障害などの後遺症はなし)．しかし肝臓に関してはほとんど血流がとまった状態に陥ったと考えられる．その結果として肝臓組織の一部が障害を受け逸脱酵素の急激な上昇となってあらわれた．そこで，メキシレチンクリアランスの低下は肝臓組織の障害により低下したと考えられるが，筆者は以下の仮説を考えている．すなわち肝血流がほとんど止まった状態ということは，薬物が代謝される組織にほとんど移行してないこと，および肝臓組織では酸素供給不足に陥っている状態になっている．そしてミクロゾーム内では酸素転移酵素である CYP がほとんど働けない状態になっている．その結果としてメキシレチンクリアランスが急激に低下し，かつ血流が戻るに伴い急激にメキシレチンクリアランスが回復したと考える．

＜症例 2＞酵素が働かないと死を迎える．

テオフィリン持続点滴の患者においてテオフィリン血中濃度が経時的に上昇してきた患者が死を迎える．数日間かけてテオフィリンクリアランスが徐々に低下してきた患者が急に死を迎えた患者を筆者は 3 例ほど経験している．本メカニズムを以下のように考えている．テオフィリンクリアランスが徐々に低下するということはテオフィリンの代謝を担う CYP の活性が徐々に低下していると考えられる．この場合の CYP は肝臓ミクロゾーム内の CYP であるが，からだ全体の CYP も同様に徐々に低下しているとは考えられないであろうか．単にミクロゾーム内の CYP がプローブになっているだけで，生体自体の酸素利用が徐々に低下し，結局は生命維持が不可能になった時点で死を迎える．筆者が経験した患者の肝臓逸脱酵素に関しては大きな変化はなかったので，テオフィリンクリアランスの低下は肝臓自体の機能低下により代謝が低下したとは考えにくい．最初は本現象に気づかなかったが最後に経験した患者の場合，死を迎えた時点で予測していたため，非常に生命現象の不思議さを覚えた．臨床現場にいれば本当にいろいろな経験と現実の厳しさ，そしてその中にあってサイエンスが求められる．本 2 症例に関しては筆者の仮説は間違っているかも知れないとの思いも強いが，他の考え方があればお教え願いたいと考えている．

ところで，本シリーズは相互作用に関する臨床からの提言であるので，以下本筋に戻そう．相互作用研究には大きく大別して 2 つに別れると考える．一つは臨床における相互作用研究であり，そこでは相互作用の危険性あるいは影響度が最大の問題点である．すなわち理論的に相互作用が考えられても通常臨床にて用いられている投与量，方法あるいは併用の可能性を考慮し相互作用として危険性がなければ問題にならない．反対に理論的に相互作用の可能性が小さくても臨床上危険性が大きければ非常に大きな問題となる．もう一方は相互作用のメカニズム解析研究と考える．近年のメカニズムに関する研究は多くの臨床における相互作用の予測が可能となってきており，まさに薬物動態学の臨床への貢献と考えられる．また最近では基礎のメカ