

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590209

研究課題名(和文)胆汁酸を核化合物とする新規プロドラッグの創製

研究課題名(英文)Development of novel pro-drugs based on the bile acid as a core compound

研究代表者

三田村 邦子(MITAMURA, Kuniko)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：70242526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ウルソデオキシコール酸のN-アセチルシステイン抱合体(UDCA-NAC)が、肝で硫酸抱合を受け一方、NACが加水分解されてUDCAとして体内を循環することを明らかにした。さらに、UDCA-NACはアセトアミノフェン誘発肝障害ラットの肝疾患マーカー酵素の上昇を抑制することを示した。これらの知見は、UDCA-NACが新規肝・胆・消化機能改善薬のプロドラッグとして有用であることを示している。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that N-acetylcysteine conjugate of ursodeoxycholic acid (UDCA-NAC) was hydrolyzed and circulated in body as UDCA after administration by injection via jugular vein, while UDCA-NAC converted to NAC-sulfate di-conjugate by rat liver cytosolic fraction. Furthermore, UDCA-NAC was shown to inhibit the increase of liver disease marker enzymes, AST and ALT, in serum of acetaminophen-induced liver injury rats. These results showed that UDCA-NAC is useful as a prodrug of the new liver, bile, digestive function improving agent.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：胆汁酸 N-アセチルシステイン プロドラッグ 肝・胆・消化機能改善薬 液体クロマトグラフィー 質量分析法

## 1. 研究開始当初の背景

ウルソデオキシコール酸 (UDCA) が適応範囲の広い肝機能改善薬として賞用され、経口製剤として供給されているが、臨床の場では、術後の経口困難な患者へ適用が可能な注射剤の開発が強く求められてきた。しかし、水溶性の UDCA 誘導体をプロドラッグとする研究開発は、化学修飾された部分構造の脱離や副作用など、多くの問題点が指摘され、いまだその成果は得られていない。一方、研究代表者らはこれまでの研究成果の一つとして、UDCA の *N*-アセチルシステイン (NAC) 抱合体が水溶性に優れるばかりか、カルボキシルエステラーゼの作用を受けて容易に UDCA と NAC を遊離することを明らかにした。さらに、NAC が薬剤性肝障害の解毒薬あるいは欧米では抗酸化作用を期待したサプリメントとしても供給されている毒性の低い化合物であることから、UDCA-NAC は水溶性に富む新規肝・胆・消化機能改善薬のプロドラッグ候補として期待される。

## 2. 研究の目的

UDCA-NAC のプロドラッグとしての有効性を明らかにするには、詳細な体内動態を解析するとともに、薬理活性と毒性を明らかにすることが必須となる。さらに、アフィニティー抽出法とプロテオミクス手法を駆使して UDCA に親和性を持つタンパク質の同定が可能となれば、UDCA の作用機序の解明、さらには、薬物代謝酵素や同定したタンパク質を標的とする胆汁酸誘導体を新規医薬品として開発する上に一助を資するものと期待される。

以上の観点から、本研究は UDCA-NAC の体内動態と薬理作用を解明し、プロドラッグとしての有効性を実証するのみならず、標的タンパク質を同定しこれらの知見を基に胆汁酸を核化合物とする新規医薬品の創製を目的とした、基礎的研究である。

## 3. 研究の方法

### (1) UDCA-NAC の肝機能改善作用と代謝に関する検討

アセトアミノフェン (AA) 誘発肝障害モデルラットに UDCA-NAC を頸静脈投与し、肝機能マーカー酵素活性を測定した。

上記ラットの血中胆汁酸代謝物を LC/MS/MS により追跡した。また、上記ラットの肝組織切片中胆汁酸代謝物をイメージング質量分析法により追跡した。

UDCA と  $d_3$ -NAC を投与したラットの尿中排泄物を LC/MS/MS により同定した。

UDCA の肝機能改善に関わるタンパク質の捕捉を目的とした UDCA をリガンドとするアフィニティー抽出用不溶性担体を調製を試みた。

### (2) GSH 抱合体胆汁酸 (BA-GSH) 及び NAC 抱合体胆汁酸 (BA-NAC) の硫酸抱合

ヒト主要胆汁酸 5 種を出発原料に、標品硫

酸抱合体 BA-GSH/-NAC 計 10 種を有機化学的に合成し、LC/MS/MS による測定法を構築した。

BA-GSH/-NAC を PAPS 存在下ラット肝サイトゾール画分とインキュベートし、生成する硫酸抱合体の量を LC/MS/MS により追跡した。

### (3) 新規胆汁酸誘導体の探索に関する研究

ヒト主要胆汁酸 5 種並びに重水素標識胆汁酸を混合酸無水物法によりグルタミンと縮合させ、グルタミン抱合体胆汁酸 (BA-Gln) を合成するとともに、LC/MS/MS による定量法を開発した。さらに、胆汁酸 CoA チオエステル並びにアシルアデニレートとグルタミンとのインキュベーション後の生成物を LC/MS/MS により定量した。

BA-GSH の代謝物として推測される BA-Cys、BA-CysGlu 並びに BA-CysGly を活性エステル法により有機化学的に合成するとともに、LC/MS/MS における特徴的イオンの生成に検討を加えた。

爬虫類や魚類の胆嚢を摘出し、胆嚢胆汁に含まれる胆汁酸代謝物を LC/MS/MS により同定した。

## 4. 研究成果

### (1) UDCA-NAC の肝機能改善作用

AA 誘発肝障害モデルラットに UDCA-NAC を頸静脈投与したところ、肝機能マーカーである血中逸脱酵素 (AST 及び ALT) の上昇が抑制されており、UDCA-NAC が肝機能改善薬として有用であることが示された。

上記ラットの血中では、遊離型、タウリン抱合体、グリシン抱合体 UDCA の上昇が認められた。また、肝切片にはタウリン抱合体 UDCA が蓄積していた。これは、投与された UDCA-NAC がカルボキシルエステラーゼにより加水分解を受け、遊離型になると同時に肝においてタウリン抱合を受けることを示唆するものである。

UDCA と  $d_3$ -NAC を投与したラット尿中に UDCA- $d_3$ -NAC が排泄されていることが明らかとなり、投与された UDCA が代謝活性化後直接 NAC と結合することが判った。

### (2) BA-GSH/-NAC の硫酸抱合

BA-GSH/-NAC はいずれも硫酸抱合を受け、二重抱合体に変換されるものの、カルボキシルエステラーゼの作用によりチオエステル結合が加水分解を受けて、大部分が遊離型並びに硫酸抱合体胆汁酸に変換されることが判った。これは投与された UDCA-NAC が生体では二重抱合体としてほとんど排泄されないことを示していた。

### (3) 新規胆汁酸誘導体の探索に関する研究

BA-Gln、BA-Cys、BA-CysGly、並びに BA-CysGlu の有機化学的合成を達成するとともに胆汁酸活性代謝物が非酵素的に Gln 抱合体へ変換することも実証した。また、同位体希釈 LC/MS/MS による定量法を開発した。

UDCA-Gln は抗大腸癌作用も期待されており、今回開発した測定法は、本化合物の動態解析上有用である。

魚類胆汁中に胆汁酸の新規代謝物である *N*-メチルタウリン抱合体が存在することを見出した。本代謝物は新規胆汁酸誘導体薬物としてその薬理作用が注目される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

{雑誌論文}(計17件)

Mitamura K, Satoh (née Okihara) R, Kamibayashi M, Sato K, Iida T, Ikegawa S, Simultaneous determination of 18 tetrahydrocorticosteroid sulfates in human urine by liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Steroids*, **85**, 18-29, 2014. (査読有) DOI: 10.1016/j.steroids.2014.03.015.

Satoh (née Okihara) R, Saito T, Ogata H, Ohsaki A, Iida T, Asahina K, Mitamura K, Ikegawa S, Hofmann AF, Hagey LR.: *N*-Methyltaurine *N*-acyl amidated bile acids and deoxycholic acid in the bile of angelfish (Pomacanthidae): A novel bile acid profile in Perciform fish. *Steroids*, **80**, 15-23 (2013). (査読有) DOI: 10.1016/j.steroids.2013.11.014.

三田村邦子, 東達也, 池川繁男: MS 解析でわかる胆汁酸の世界, 分子消化器病, **9**, 273-278 (2012). (査読無) DOI: なし.

Hagey LR, Ogawa S, Kato N, Satoh née Okihara R, Une M, Mitamura K, Ikegawa S, Hofmann AF, Iida T: A novel varanic acid epimer — (24*R*, 25*S*)-3*α*,7*α*,12*α*,24-tetrahydroxy-5*β*-cholestan-27-oic acid — is a major biliary bile acid in two varanid lizards and the Gila monster. *Steroids*, **77**, 1510-1521 (2012). (査読有) DOI: 10.1016/j.steroids.2012.08.017.

Mitamura K, Hori N, Mino S, Iida T, Hofmann AF, Ikegawa S, Synthesis of the 3-sulfates of *S*-acyl glutathione conjugated bile acids and their biotransformation by a rat liver cytosolic fraction. *Chem. Phys. Lipids*, **165**, 261-269 (2012). (査読有) DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2012.02.001.

Mitamura K, Hori N, Iida T, Suzuki M, Shimizu T, Nittono H, Takaori K, Takikawa H, Hofmann AF, Ikegawa S: Identification of *S*-acyl glutathione conjugates of bile acids in human bile by means of LC/ESI-MS. *Steroids*, **76**, 1609-1614 (2011). (査読有) DOI: 10.1016/j.steroids.2011.10.001.

Mitamura K, Aoyama E, Sakai T, Iida T, Hofmann AF, Ikegawa S: Characterization of non-enzymatic acylation of amino or thiol groups of bionucleophiles by the acyl-adenylate or acyl-CoA thioester of cholic acid. *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 2253-2259 (2011). (査読有) DOI: 10.1007/s00216-011-4961-z.

Mitamura K, Sakai T, Nakai R, Wakamiya T,

Iida T, Hofmann AF, Ikegawa S, Synthesis of the 3-sulfates of *N*-acetylcysteine conjugated bile acids (BA-NACs) and their transient formation from BA-NACs and subsequent hydrolysis by a rat liver cytosolic fraction as shown by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 2061-2072 (2011). (査読有) DOI: 10.1007/s00216-011-4925-3.

{学会発表}(計34件)

齊藤徹也, ピラルクー(*Arapaima gigas*)の胆嚢胆汁から新規胆汁酸タウリン抱合体の単離と構造決定、日本薬学会第134年会、2014.3.28-30、熊本市総合体育館(熊本市)。

三田村邦子, 尿中ステロイドのLC-MS/MS、第60回日本臨床検査医学会学術集会、2013.11.1-5、神戸国際会議場(神戸市)。

池川繁男, Barrett 食道患者の胃液内胆汁酸の解析、日本薬学会第133年会、2013.3.28-30、パシフィコ横浜(横浜市)。

池川繁男, グルタミン抱合型胆汁酸の合成とそれらのESI-MSにおける挙動、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、2012.10.20、武庫川女子大(西宮市)。

Ikegawa S, Identification of *S*-acyl glutathione conjugates of bile acids in human bile by means of LC/ESI-MS. XXII Bile Acid Meeting, 2012.10.15-16, Hilton Vienna Hotel (Vienna, Austria).

池川繁男, 安定同位体希釈 LC/ESI-MS/MS による尿中グルタミン抱合型胆汁酸の高感度測定法の開発、第52回臨床化学学会年次学術集会、2012.9.6-8、岩手県民情報センター(盛岡市)。

Ikegawa S, Liquid chromatography-mass spectrometric characterization of sulfation of glutathione conjugated bile acids by a rat liver cytosolic fraction. 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2012. 5 20-24, Vancouver Convention Center (Vancouver, Canada).

三田村邦子, LC/MS によるグルタチオン抱合型胆汁酸の動態解析、第60回日本分析化学会、2011.9.5、名古屋大学(名古屋市)。

三田村邦子, *N*-アセチルシステイン抱合型ウルソデオキシコール酸の体内動態と肝機能改善作用に関する基礎的検討、2011.7.23、リーガロイヤルホテル大阪(大阪市)。

三田村邦子, グルタチオン抱合型胆汁酸3-サルフェートの合成とラット肝サイトゾール画分における生成、第28回日本胆膵病態生理研究会、2011.6.18、福大メディカルホール(福岡市)。

{図書}(計2件)

池川繁男, 三田村邦子, 試料分析講座 脂質分析、丸善、2011、135-148.

東達也, 三田村邦子, 分析化学便覧、丸善、2011、389-392.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

三田村 邦子 ( MITAMURA, Kuniko )

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：70242526

(2)研究分担者

池川 繁男 ( IKEGAWA, Shigeo )

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：90111301