

P450-Glo™ CYP3A4 Biochemical and Cell-Based Assays

P450-Glo™ CYP3A4を用いた生化学解析とセルベースアッセイ

By Mary Sobol, M.S, Dongping Ma, M.S, and James J. Cali, Ph.D., Promega Corporation

アブストラクト

多くの治療薬の生物学的効能やクリアランスは、まずシトクロムP450酵素により媒介されます。一方で、P450の活性変化により薬物間相互作用が頻繁に起こる事が知られています。本稿では、薬物探索の初期段階でP450の誘導あるいは阻害が基となる薬物間相互作用を予測できるシトクロムP450アッセイをご紹介します。ここでは、CYP3A4酵素のアッセイに焦点を当てています。このCYP3A4酵素はヒトの肝臓にあるP450のうち約30%を占めており、初期代謝の後に排除される全ての薬物の約半数を酸化します。今回我々は3種の発光性のCYP3A4基質：Luciferin-BE、Luciferin-PFBE、Luciferin-PPXEを開発しました。これらの基質は、リコンビナントCYP3A4を用いたin vitroでの生化学解析で被験化合物によるP450阻害を検出するためのプローブとして使用されています。さらに、Luciferin-PFBEは、薬物によるCYP3A4遺伝子誘導のセルベース測定に有効です。セルベースアッセイは迅速かつ簡易的であり、細胞非溶解法が実施できるため、次の解析に使用できるインテグレーション細胞状態を保つことができます。

イントロダクション

シトクロムP450酵素（P450s）は、治療薬を含む広範な疎水性化合物の酸化代謝系で主要な触媒作用を持ちます（1,2）。結果的に多くの薬物の生物学的効能やクリアランスはP450により影響を受けることになります。また、P450活性が変化するため、不都合な薬物間相互作用（DDI）も頻繁に起こります（3）。DDIの1つのタイプとして、2種類の薬物が投与される際に、第1の薬物が、第2の薬物を代謝するP450を阻害することによって第2の薬物を毒性レベルにまで蓄積する現象が挙げられます。また、2つめのDDIタイプは第1の薬物がP450遺伝子の発現を誘導した際に起き、これによってP450活性が増加し、クリアランス効果を加速させ、第2の薬物が有する効能を低下させます。そのために薬物が開発され、処方される中でそれらがP450にどう影響するかを認識することは非常に重要です。

薬物を代謝するP450の中でもCYP3A4は最も重要です（4）。CYP3A4は、多くの低分子有機化合物を酸化し、またこれにより阻害されます。また、CYP3A4遺伝子も多種多様な化合物により誘導されるため、CYP3A4はDDIに深く関与すると考えられます。P450の中でもCYP3A4の誘導と阻害は、プローブ基質を用いた被験化合物による酵素活性への効果を測定することで研究されています。

P450-Glo™ Assayテクノロジー（図1）は薬物探索や開発の初期段階において、誘導および阻害をベースとしたDDI予測に適した迅速なハイスループットアプローチです（5）。発光技術を用いたP450-Glo™ Assayは蛍光や非光学法に対していくつかの利点があります。このアッセイは、HPLCを用いたアッセイの処理量の限界や放射性化合物を用いたアッセイで生じる放射性物質の安全性の問題、蛍光プローブを用いたアッセイでおこる蛍光性被験物質による干渉を排除することができます。P450-Glo™ Assayでは分析物質D-ルシフェリンを測定しますが、D-ルシフェリンを検出するためのホタルルシフェラーゼアッセイが高感度であるためP450の測定も高感度となります。本稿では主要な薬物代謝酵素CYP3A4に対するP450-Glo™ 基質を中心に紹介します。

P450-Glo CYP3A4の発光基質

我々は、これまでにルシフェラーゼを用いたP450-Glo™ テクノロジー（5）で使用する3種の発光性CYP3A4基質を開発しました。それぞれの基質は、発光ルシフェラーゼ基質D-ルシフェリンのルシフェラーゼ末反応型誘導体です。P450酵素は、最初の反応でその基質をルシフェラーゼ反応型D-ルシフェリンに変換します。ルシフェラーゼによる第2の反応で生じる発光シグナルはD-ルシフェリンの濃度に比例し、P450酵素活性を反映しています（図1）。CYP3A4基質はLuciferin-BE、Luciferin-PFBE、Luciferin-PPXEで、それぞれD-ルシフェリンの主要構造を有しますが、切断可能な修飾基が異なります（図2）。基質を選択する上で考慮する点は、P450酵素の選択性、DMSO感受性、CYP3A4の由来（ミクロソーム vs 細胞）などがあります。

それぞれのP450-Glo™ CYP3A4基質の選択性は図2に示します。図2のグラフは、3種の基質に対して21種のリコンビナントヒトP450パネルを用いてその選択性を調べたものです。Luciferin-PFBEとLuciferin-PPXEがCYP3A4酵素にしか十分な活性を示さなかったのに対して、Luciferin-BEはCYP3A4、3A5、3A7、4F12で活性を示しました。CYP3A4、3A5、3A7は多くの基質や阻害物質を共有しますが、これらの発現パターンは異なっています。CYP3A4は成人の肝臓や腸で発現する主要な形態で、CYP3A5は通常、CYP3A4に比べ非常に低レベルの発現しか示さず、成人でのみ発現しています（6）。CYP3A7は胎児の肝臓において優勢なCYP3Aであり、誕生から初期の幼年期を経て徐々に消失し、CYP3A4とCYP3A5へと置き換わっていきます（7）。発光性CYP3A4基質に対する交差反応性パターンは、単一のP450を含むリコンビナントまたは精製したP450調製物をアッセイする際には問題になりません。一方でヒトの肝臓ミクロソームといったネイティブな調製物またはセルベース肝細胞アッセイでの基質に対する活性を見る場合は、いくつかまたは全ての交差反応酵素による影響を考慮する必要があります。

P450-GLO™ CYP3A4 Assayパフォーマンス

CYP3A4反応の用量依存性や時間や酵素濃度に対する直線性を図3に示します。P450-Glo™ 反応産物であるD-ルシフェリンの蓄積に対するタイムコースは、3つの基質でそれぞれ異なります。全ての反応は37℃で10分またはそれ以上の時間で直線的な産物の蓄積を示しています（図3、パネルA）。反応が24℃で行われると、それぞれの基質で直線性がより持続します（データ未掲載）。それぞれの反応は非常に高感度であり、CYP3A4の検出限界はLuciferin-BEとLuciferin-PPXEでは < 0.01pmol、Luciferin-PFBEでは <0.001pmolです（図3、パネルB）。基質用量依存性は、時間と温度に関して直線性が得られた条件下で測定を行いました（図3、パネルC）。それぞれの反応は基質飽和を示しました。基質阻害は高濃度のLuciferin-PFBE、Luciferin-PPXEで観察され、

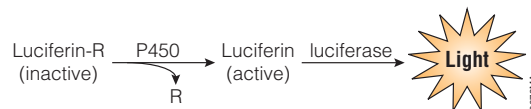


図1. シトクロムP450によるP450-Glo™ 基質の変換

シトクロムP450酵素は、ルシフェリン検出試薬で発光するルシフェリン物質を生成する発光性基質に作用する。この検出試薬はP450反応 終了後に添加する。

Luciferin-BEでは、 $>200\mu\text{M}$ の濃度で観察されました（データ未掲載）。基質阻害はCYP3A4反応で一般的に認められる特性であるため、発光性基質についても予想できないことではありませんでした。実際にCYP3A4の特殊な動態は広く研究されています(8,9)。CYP3A4基質の用量依存曲線は、従来双曲線を描くミカエリス・メンテンモデルとの適合性が低いことから、最大活性の半分が観察される基質濃度としてKm値よりむしろ S_{50} 値であらわされる場合があります(10)。Luciferin-BEとLuciferin-PFBE、Luciferin-PPXEの S_{50} 値はそれぞれ約 $50\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 、 $25\mu\text{M}$ です。

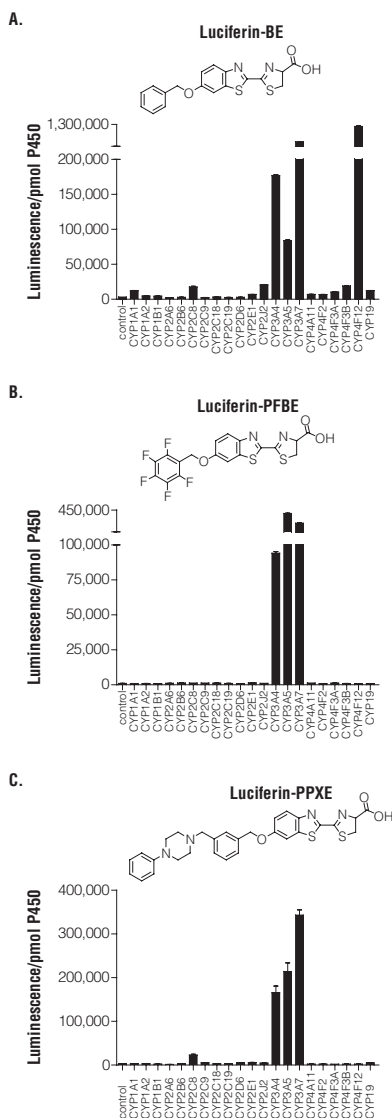


図2. P450酵素の基質選択性

昆虫細胞発現系からマイクロソームで発現した21種のリコンビナントヒトP450アイソフォームを用いて、Luciferin-BEとLuciferin-PFBE、Luciferin-PPXEに対する活性を96ウェル白色ルミノメータープレートで測定した。それぞれ酵素1pmolを、 $50\mu\text{M}$ 基質、NADPH再生システムと共に KPO_4 バッファー (pH7.4) を含む $50\mu\text{l}$ 反応液中で 37°C 、30分間インキュベーションした。ルシフェリン検出試薬を加え、発光はGloMax™ 96 Microplate luminometer (カタログ番号 E6521) を用いて測定した。結果は平均±標準偏差、 $n=3$ として示した。

多くのCYP3A4反応は、一般的な有機溶媒ジメチルスルフォキシド (DMSO; 11) によって阻害されます。これは、被験化合物の濃縮ストック溶液がDMSOで溶解されているときに問題となり、薬物ライブラリーでは頻繁に見受けられます。Luciferin-BEやLuciferin-PFBEを用いたCYP3A4反応ではDMSOに対して著しい感受性を示しますが、Luciferin-PPXEとの反応では認められません (図4)。そのため、Luciferin-PPXEはDMSOの使用が避けられない、あるいは低減できない場合に選択する基質です。Luciferin-BEとLuciferin-PFBEを用いたCYP3A4反応では、被験化合物の濃縮ストック溶液の溶媒としてアセトニトリルの使用が推奨されます。全ての3基質とのCYP3A4反応は、約2%までのアセトニトリルに非感受性を示します (データ未掲載)。

どのCYP3A4基質を用いて化合物をスクリーニングする場合でも、CYP3A4が基質や阻害剤を複数かつ重複せずに結合することを認識することは重要なことです (12,13)。さらに、化合物の中には、共存する

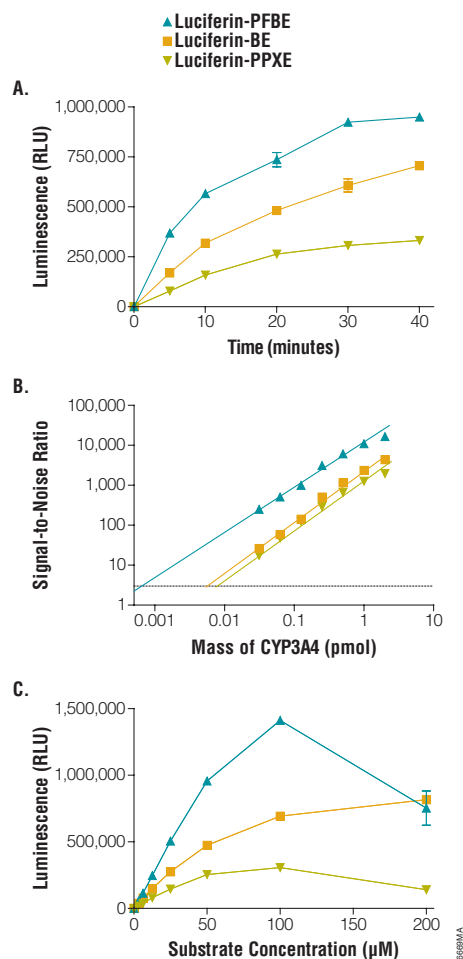


図3. CYP3A4 アッセイの特徴

CYP3A4活性は、Luciferin-BEとLuciferin-PFBE、Luciferin-PPXE基質を用いて測定した。**パネルA**：1pmol CYP3A4、 $50\mu\text{M}$ Luciferin-BE、 $50\mu\text{M}$ Luciferin-PFBE または $30\mu\text{M}$ Luciferin-PPXEを含む $50\mu\text{l}$ 、 37°C 反応系における時間依存的シグナルの増加。**パネルB**： $50\mu\text{M}$ Luciferin-BE、 $50\mu\text{M}$ Luciferin-PFBEまたは $30\mu\text{M}$ Luciferin-PPXE を用いた 37°C 、10分間の反応系におけるCYP3A4酵素濃度依存性。**パネルC**：1pmolリコンビナントCYP3A4を用いた 37°C 、10分間の反応系での基質用量依存性。

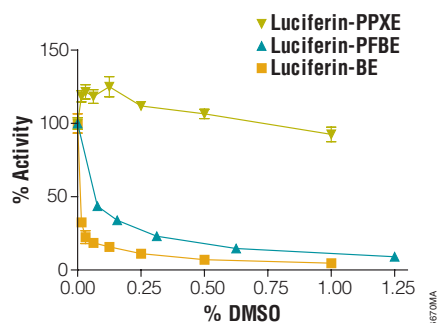


図4. CYP3A4反応のDMSO感受性

DMSO増加にともなうCYP3A4の活性測定。測定は1pmol CYP3A4、50μM基質を用いて37℃、30分間行った。

とCYP3A4と正の共同性を示すものもあります。1つの例として、ある化合物が次の化合物とともに活性を刺激することが挙げられます(14,15)。CYP3A4と基質／阻害剤の結合の明確な立体配置について様々な議論がありますが、テストステロン、ミダゾラム、ニフェジピンがどこに結合するかということについて言及されることが多くあります(12,16)。被験化合物の結合が基質と重複するならば阻害物質となり、重なり合っていない位置に結合した場合、その物質は反応を活性化するか、影響しないということになります。Luciferin-PPXEに対する活性は、ミダゾラム、ニフェジピンによって阻害され、テストステロンによって活性化されるため、本基質は、これら3つの結合様式を示す化合物の検出に使用することができ、多くの場合阻害し、時として活性化させる場合も有ります(表1)。Luciferin-BEとLuciferin-PFBE反応は、ミダゾラムによって阻害を受けますが、ニフェジピンとテストステロンによって活性化されます。しかし、Luciferin-BEおよびLuciferin-PFBEは3つのクラスすべての化合物を検出することができませんが、Luciferin-PPXEよりも高頻度で活性化物質を検出します。3つの発光性基質を用いたCYP3A4反応より得られたIC₅₀値は、従来のアッセイを用いて発表された値と非常に相関性があることが確認されています(表1; 5, 17-23)。

セルベースCYP450アッセイ

発光性基質P450-Glo™ CYP3A4基質は細胞透過性があることからセルベースアッセイでCYP3A遺伝子の誘導を検出するのに役立ちます。誘導はCYP3A酵素活性の増加として測定されます。ヒトの肝細胞などでは、この増加はCYP3A4、3A5、3A7活性の合算となります(図2)。セルベースアッセイを行うために細胞を単層培養し、被験化合物で処理します。十分な時間処理した後、通常48時間、発光性基質を培地に添加し、あらかじめ決められた時間、通常は3~4時間細胞と共にインキュベーションします。基質は細胞内に拡散し、P450酵素によって代謝され、反応産物が培地の中に拡散します。培地サンプルと等量のルシフェリン検出試薬を混合することにより生じた発光を測定しP450活性として収集します。被験化合物で処理した細胞からの発光が無処理コントロールよりも高くなれば誘導が観察されたことになります。図5では、CYP3A4遺伝子の誘導剤としてよく知られている抗生物質、リファンピシンの効果を調べるためにヒトのドナーからの新鮮な肝細胞を使った例を示しています(24)。3つの基質のうちLuciferin-PFBEが誘導を検出するのに最も効果的です(図5, パネルA)。Luciferin-PFBEで認められた誘導倍率は、CYP3A酵素活性のマーカーとしてテストステロンの水酸物を測定する従来のアッセイと非常に良く相関しました(図5, パネルB)。Luciferin-PFBEに対する活性は、フェノバルビタールのような他のCYP3A遺伝子誘導物質によっても誘導されます(25)。基底活性やLuciferin-PFBE使用時のリファンピシンより誘導された活性がCYP3A阻害剤であるケトコナゾールによる阻害に対して感受性を示すことからCYP3Aによるものであることが確定されました(図5, パネルC)。

表1. リコンビナントCYP3A4の阻害

CYP3A4反応のIC₅₀値を文献で公表された値や様々な非発光法実験により得られた値と比較した。

被験化合物	Luciferin-BE ^(1,2) 使用時の IC ₅₀ 値 (μM)	Luciferin-PFBE ^(1,2) 使用時の IC ₅₀ 値 (μM)	Luciferin-PPXE ^(1,2) 使用時の IC ₅₀ 値 (μM)	公表されている IC ₅₀ 値 (μM) 被験化合物
ミダゾラム	17.4	26.0	8.3	1.3–59.8 (17)
ニフェジピン	+	+	19.9	+, 0.2–17.2 (18)
テストステロン	+	+	+	+
ケトコナゾール	0.1	0.2	0.1	0.1–0.2 (17)
エリスロマイシン	1.2	0.7	6.5	1.8–74 (17)
トロレANDOMAisin	0.2	0.1	0.3	0.3–6.1 (17)
ペラバミル	0.04	0.5	0.5	0.12–4.0 (17,21)
クロトリマゾール	0.01	n.d.	0.02	0.002–0.06 (17,22)
アザムリン	0.1	0.1	0.5	0.03, 0.12 (23)

1. 発光性基質はS₅₀濃度または、それに近い濃度で使用し、反応には特定の濃度幅の被験化合物を用いた。値が複数または幅がある場合、通常、フローベース基質の阻害依存性を反映(16)。

2. “+”は正の共同性が観察されたことを示す。発光基質によるCYP3A4活性を刺激した被験化合物。n.d. = not determined

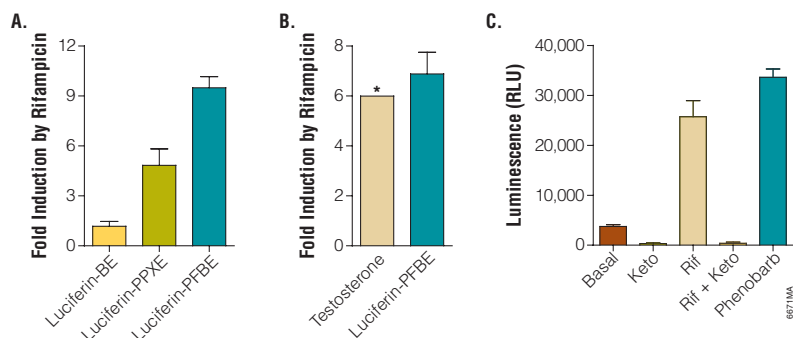


図5. セルベースCYP3A4誘導アッセイ

96ウェルプレートで単層培養したヒトの肝細胞を10μMリファンピシンまたは0.5mMフェノバルビタールで48時間処理した。発光性基質（終濃度50μM）を培地に添加し、4時間インキュベーションした後、ルシフェリン検出試薬と混合するために培地サンプルを別プレートに移した。発光はGloMax™ 96 Microplate luminometer（カタログ番号E6521）を用いて測定した。**パネルA**：Luciferin-BEとLuciferin-PFBE、Luciferin-PPXEとともに新鮮なヒトの肝細胞を用いた。誘導倍率は、リファンピシン処理した活性（誘導活性）を、未処理の細胞活性（基底活性）で割って算出した。**パネルB**：Luciferin-PFBEとともに凍結保存したヒトの肝細胞を用いた（*は細胞の供給先であるIn Vitro Technologiesにより報告されているテストステロンアッセイによる誘導倍率であることを示す）。**パネルC**：ケトコナゾール（keto, 10μM）は、コントロール細胞およびリファンピシン処理細胞(rif)において、Luciferin-PFBEとともに併用した。

結論

今回我々は、P450酵素の阻害と遺伝子誘導をモニタリングする際に、Luciferin-BEとLuciferin-PFBE、Luciferin-PPXEが、成人のヒト肝細胞で優勢なP450酵素であるCYP3A4に対して理想的なプローブ基質であることを示しました。これらの基質で得られた結果は従来のCYP3A4アッセイで行った結果と良く相関していました。また、Luciferin-PFBEは細胞非溶解セルベースアッセイに最適であり、インタクトな細胞が維持されることで、細胞を次の解析に使用することもできます。このようにP450-Glo™ アッセイは、セルベースまたは生化学アッセイを用いてCYP3A4が関与する有害な薬物間相互作用の最も一般的な2つの要因を予測する上で、迅速かつ安全そして簡便な方法です。

参考文献

- Wrighton, S.A. *et al.* (1992) *Crit. Rev. Toxicol.* **22**, 1–21.
- Bjornsson T.D. *et al.* (2003) *Drug Metab. Dispos.* **31**, 815–32.
- Weinkers, L.C. *et al.* (2005) *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 825–33.
- Rostami-Hodjegan, A. and Tucker, G.T. (2007) *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 140–8.
- Cali, J.J. *et al.* (2006) *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2**, 629–45.
- Williams, J.A. *et al.* (2002) *Drug Metab. Dispos.* **30**, 883–91.
- Leeder, J.S. *et al.* (2005) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**, 626–35.
- Tracy, T.S. (2006) *Drugs R. D.* **7**, 349–63.
- Korzekwa, K.R. *et al.* (1998) *Biochemistry* **37**, 4137–47.
- Hosea, N.A. *et al.* (2000) *Biochemistry* **39**, 5929–39.
- Busby, W.F. *et al.* (1999) *Drug Metab. Dispos.* **27**, 246–9.
- Galetin A. *et al.* (2003) *Drug Metab. Dispos.* **31**, 1108–16.
- Domanski, T.L. *et al.* (2001) *Biochemistry* **40**, 10150–60.
- Ueng, Y.F. *et al.* (1997) *Biochemistry* **36**, 370–81.
- Cameron, M.D. *et al.* (2005) *Biochemistry* **44**, 14143–51.
- Wang, R.W. *et al.* (2000) *Drug Metab. Dispos.* **28**, 360–6.
- Stresser, D.M. *et al.* (2000) *Drug Metab. Dispos.* **28**, 1440–8.
- Shen, L. *et al.* (2004) *Drug Metab. Dispos.* **32**, 186–96.
- Kariv, I. *et al.* (2001) *J. Biomol. Screen.* **6**, 91–9.

- Moody, G.C. *et al.* (1999) *Xenobiotica* **29**, 53–75.
- Ekins, S. *et al.* (2003) *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 161–6.
- Racha, J.K. *et al.* (2003) *Drug Metab. Pharmacokinet.* **18**, 128–38.
- Stresser, D.M. *et al.* (2004) *Drug Metab. Dispos.* **32**, 105–12.
- Sinz, M. *et al.* (2006) *Curr. Drug Metab.* **7**, 375–88.
- Luo, G. *et al.* (2004) *Cur. Drug Metab.* **5**, 483–505.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
P450-Glo™ CYP3A4 Assay (Luciferin-PFBE) Cell-Based/Biochemical Assay*	10 ml	V8901	17,000
P450-Glo™ CYP3A4 Assay (Luciferin-PPXE) DMSO-Tolerant Assay*	10 ml	V8911	17,000
P450-Glo™ CYP1A1 Assay*	10 ml	V8751	17,000
P450-Glo™ CYP1B1 Assay*	10 ml	V8761	17,000
P450-Glo™ CYP1A2 Assay*	10 ml	V8771	17,000
P450-Glo™ CYP2C8 Assay*	10 ml	V8781	17,000
P450-Glo™ CYP2C9 Assay*	10 ml	V8791	17,000
P450-Glo™ CYP3A4 Assay*	10 ml	V8801	17,000
P450-Glo™ CYP3A7 Assay*	10 ml	V8811	17,000
P450-Glo™ CYP2C19 Assay*	10 ml	V8881	17,000
P450-Glo™ CYP2D6 Assay*	10 ml	V8891	17,000
P450-Glo™ CYP3A4 Screening System (Luciferin-PPXE) DMSO-Tolerant Assay	1,000 assays	V9910	130,000
P450-Glo™ CYP1A2 Screening System	1,000 assays	V9770	130,000
P450-Glo™ CYP2C9 Screening System	1,000 assays	V9790	130,000
P450-Glo™ CYP3A4 Screening System	1,000 assays	V9800	130,000
P450-Glo™ CYP2C19 Screening System	1,000 assays	V9880	130,000
P450-Glo™ CYP2D6 Screening System	1,000 assays	V9890	130,000

*Other sizes are available.