

カルボキシルエステラーゼ研究の現状とプロドラッグ体内動態の予測

今 井 輝 子*

熊本大学薬学部

Current Research for Carboxylesterase and Prediction of Bioavailability of Prodrug

TERUKO IMAI*

School of Pharmacy, Kumamoto University, 5-1 Oe-honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan

Summary: A prodrug is a pharmacologically inactive derivative of an active parent drug, and it that is bioconverted to the active drug *in vivo*. Through the chemical modification of a drug to a prodrug, we are able to deliver drugs into to the target site, to optimize therapy and minimize toxicity. A major pathway for the bioconversion of prodrugs to the active parent drugs is *via* carboxylesterase (CES) activity. Among human CES isozymes, hCES1 and hCE2 predominantly participate in the hydrolysis of prodrugs in the liver and small intestine, respectively, although the substrate specificity is quite different between two isozymes. Since the expression levels of CES vary among individuals, there is a range of pharmacological responses following prodrug administration. Species differences are caused by the tissue-dependent hydrolase activity mediated by CES, which makes it difficult to predict effectiveness in humans from a preclinical study using animals. The hydrolysis parameter of several ester prodrugs in the *in situ* rat jejunal single pass perfusion has been related to the *in vitro* hydrolysis parameter in the intestinal S9, in order to propose the noble quantitative prediction of intestinal first pass metabolism by *in vitro-in situ* correlation. We have developed a novel experimental method for predicting the human intestinal absorption of prodrugs using Caco-2 cells in which CES-mediated hydrolysis has been inhibited. The expression of hCE1 and hCE2 shows inter-individual variation and is regulated by several mechanisms, such as gene polymorphism and epigenetic processes. Understanding of the regulation of CES expression and species difference of CES catalytic properties will be helpful in the design of prodrugs with increased specificity and enhanced physicochemical and biological properties.

Keywords: prodrug; carboxylesterase; species differences; gene polymorphism; intestinal absorption

近年、バイオアベイラビリティや薬効の改善を目的として、エステル結合やアミド結合を有する医薬品が多数合成され、臨床応用されている。代謝物が活性体である場合、プロドラッグと呼ばれ、その開

発は増加傾向にある。そのため、効率的なプロドラッグデザインやヒトにおける体内動態の予測を目的として、プロドラッグの生体内変換に寄与するエステラーゼの機能解析が注目されるようになってきた。しかしながら、エステラーゼと呼ばれる酵素集団の解明は、ほとんどなされていないのが現状である。エステラーゼの中で異物代謝に最も関与するのはカルボキシルエステラーゼ (CES) である。例えば、抗インフルエンザ薬のオセルタミビルは主に CES1 ファミリーによって加水分解され、抗ガン薬

*1979 年熊本大学薬学部卒。同助手を経て、1999 年同大薬学部病態薬効解析学教授に就任。2009 年日本薬物動態学会フェロー、2010 年永井記念国際女性科学者賞。研究テーマ：エステラーゼの機能解析に基づくプロドラッグデザイン。日課：愛犬トムとの散歩。趣味：創作料理、エアロビクス。連絡先：〒862-0973 熊本市大江本町 5-1 E-mail: iteruko@gpo.kumamoto-u.ac.jp

のイリノテカン¹⁾はCES1とCES2ファミリーの両者によって加水分解される。しかしながら、実際に生体内では、単一酵素群によって生体内変換される例は少なく、CES活性を阻害しても10~20%の加水分解活性が残ることが多い。また、異物代謝への関与が全く知られていない酵素が、プロドラッグの変換に関わることもある。プロドラッグのデザインや体内動態予測のためには、全てのエステラーゼを解析することが望ましいが、エステラーゼの研究人口は少なく、全貌解明までには十数年あるいは数十年が必要であろう。本稿では、エステラーゼとして機能解明が最も進んでいるCES研究の現状とプロドラッグの体内動態予測について概説する。

1. エステラーゼの分類

エステラーゼは加水分解を担う酵素の総称であり、有機リン剤(OP)に対する反応性の違いから3グループに大別される¹⁾。OPを基質とするA-Esterase, OPによって阻害されるB-Esterase, およびA, Bの何れにも属さないC-Esteraseの3グループである。A-Esteraseの代表的酵素はHDLの構成成分であるParaoxonase(別名:Arylesterase, EC3.1.1.2)である。Paraoxonaseの活性中心については、これまで様々な議論があったが、最近のX線結晶構造解析の結果から、活性中心として、2つのHis残基が触媒ダイアードを形成し、カルシウムなどの2価イオンの存在下で活性を示す説が有力である。C-Esteraseとしては血小板活性化因子として作用するAcetylcholinesterase(EC3.1.1.6)があるが、詳細は検討されていない。一方、B-Esteraseに分類される酵素には、Carboxylesterase(CES, EC3.1.1.1), Acetylcholinesterase(AChE, EC3.1.1.7), Butyrylcholinesterase(Cholinesterase, EC3.1.1.8)などの、Serを活性中心として触媒トライアードを形成する多くのセリンプロテアーゼがこのグループに分類される。このように、CESはエステラーゼと呼ばれる酵素群の一角であり、代謝酵素としての詳細な機能解析が進んでいる唯一のエステラーゼである。

2. カルボキシルエステラーゼの分子種と組織分布

カルボキシルエステラーゼ(CES)は、ヒト肝臓の主要なCESアイソザイムであるhCE1のアミノ酸配列の相同性から、CES1からCES5の5つのフ

ファミリーに分類されている²⁾。さらに、それぞれのファミリーはサブファミリーに分類される。CESはC末のアミノ酸4残基が小胞体膜のKDELレセプターに認識されて膜結合し、酵素本体は小胞体内腔に存在する。CESの生体内における生理的役割は脂質代謝であり、コレステロールエステルや脂肪酸エステルの加水分解とエステル合成反応の両者を触媒する酵素である。したがって、活性中心にアルコールが存在すれば、エステル形成反応を触媒する³⁾。アルコール中毒患者がコカインを服用した場合、肝臓CES(hCE1)によってコカエチレンが生成され、脳移行を促して重篤な症状を呈することは周知のことである。

この反応を逆手にとると、アルコールを基剤中に添加することにより、投与部位で加水分解を最小限にとどめて、プロドラッグとして血中移行させる製剤化が可能と考えられる。アルコールとしてプロピレングリコール等を利用することにより、加水分解コントロール型の経皮投与剤を提案できるのではないだろうか。ただし、この反応はヒトCESの場合、CES1ファミリーのhCE1にのみ備わった機能であり、CES2ファミリーにはエステル化反応に対する触媒能はない⁴⁾。したがって、CES分子種の反応特性および臓器分布を理解することは、非常に重要である。

Table 1に各動物におけるCESファミリーの臓器分布を示す⁵⁾。CES1とCES2ファミリーの組織分布は、動物種によって異なる。例えば、多くの動物種の小腸にはCES2ファミリーが存在するが、イヌにはCESのみならず、加水分解活性を示す酵素の発現レベルが極めて低い。また、サル小腸にはCES1ファミリーも存在する。一方、肝臓には多くの動物種でCES1ファミリーが主に発現し、CES1よりも低いレベルでCES2ファミリーが発現する。特徴的に、ラット肝臓にはCES2ファミリーが存在しないが、少なくとも4種以上のCES1アイソザイムが発現する。腎臓にはヒト、サル、イヌではCES2ファミリーが存在するのに対し、ラットではCES1ファミリーが発現し、マウスでは両ファミリーが存在する。このように、CESの組織分布には大きな種差がある。さらに、げっ歯類の血漿中にはC末の4アミノ酸残基が欠如した分泌型のCES1酵素が存在する。それぞれのCESアイソザイムの基質認識性や

Table 1. Tissue-specific expression profile of CES isozymes in mammals and humans.

Species	Isozyme	Small intestine	Liver	Kidney	Lung	plasma
Mouse	CES1	—	+++	+++	+++	+++
	CES2	+++	+++	+++	—	—
Rat	CES1	—	+++	+++	+++	+++
	CES2	+++	—	—	—	—
Beagle Dog	CES1	—	+++	+	+++	—
	CES2	—	++	+++	+	—
Monkey	CES1	++	+++	+	NT	—
	CES2	+++	++	+++	NT	—
Human	CES1	—	+++	—	+++	—
	CES2	+++	++	+++	—	—

—, undetectable; +, weakly expressed; ++, moderately expressed; +++, strongly expressed; NT, not tested.

エステル形成能は異なるため、動物実験で得られた体内動態からヒトの体内動態を単純に外挿することはできず、慎重に取り扱う必要がある。

3. CES の反応メカニズムと基質認識性

CES による触媒活性には、Ser, Glu, His から構成される触媒トライアドと基質の遷移状態を安定化するオキシアニオンホールが重要な役割を果たす。まず、基質が酵素活性中心に到達すると、触媒トライアドによって活性化された Ser の水酸基が、基質のカルボニル基を求核攻撃し、四面体中間体（遷移状態）を形成し、オキシアニオンホール（Gly-Gly）の主鎖の窒素原子との水素結合によって安定化される。その後、アシル-酵素中間体を形成すると同時に、基質から遊離したアルコール基は拡散によって活性中心から出ていく。次に、第 2 番目の基質として、活性中心近傍に存在する H_2O が触媒トライアドの His によって活性化され、生成した OH^- がアシル-酵素中間体を攻撃してアシル基が酵素から遊離する (Fig. 1)。この 2 段階反応のメカニズムは CES のみならず、すべてのセリンプロテアーゼに共通のメカニズムであり、生成物も同じである。しかしながら、基質認識性には大きな相違がある。CES1 と CES2 ファミリー酵素の基質特異性の相違については、ヒトアイソザイムである hCE1 と hCE2 で良く検討されている。hCE1 の基質には、Methylphenidate, Temocapril, Cocaine (methyl ester), Flurbiprofen hydroxyethyl ester などアルコール基に比べてアシル基が高高い構造のものが多い⁴⁾。ACE 阻害薬の Imidapril, Delapril, Quinapril

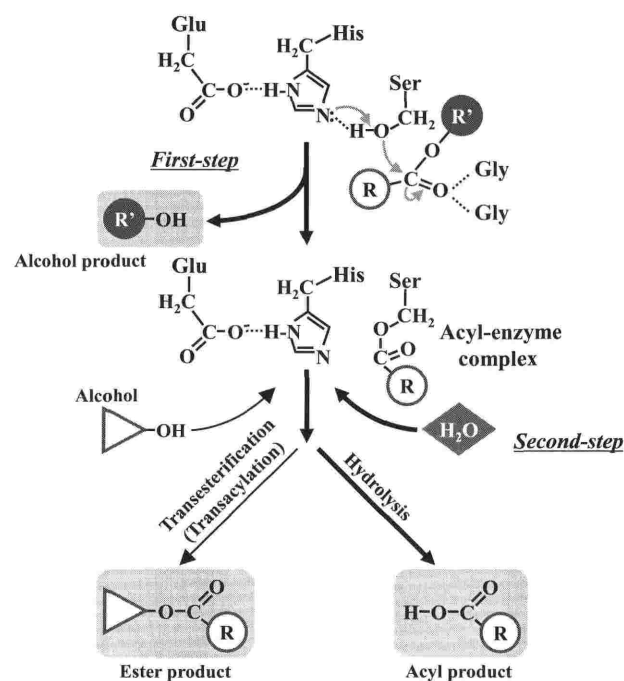


Fig. 1. The two-step hydrolysis of CES.

なども hCE1 に特異的な基質である。これに対し、hCE2 に特異性の高い基質は、CPT-11, Cocaine (benzoyl ester), Aspirin のようにアルコール置換基に比べてアシル基が小さい基質であり、hCE2 はアシル基が高高い化合物を加水分解し難い特徴がある。これまでに、ヒト CES1 酵素の hCE1 とウサギ肝臓 CES (Rabbit 1) について X-線構造が解析されているが⁶⁾、CES1 酵素の活性中心は Rigid site と Flexible site から構成され、活性中心が広いためにさまざまな構造の基質を加水分解すると予測されている。一方、CES2 酵素の構造解析はなされていないが、アミノ酸配列から Flexible site を構成する

Table 2. Possible haplotypes of the CES1A genes and mRNA levels of CES1A1 and CES1A2 in human livers.

<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> Haplotype A </div> <div style="text-align: center;"> Haplotype C </div> </div>				
<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> Haplotype B </div> <div style="text-align: center;"> Haplotype D </div> </div>				
Group	Diplotype (Haplotype/ Haplotype)	Number of samples	CES1A1/GAPDH mRNA (copy/0.1 µg)	CES1A2/GAPDH mRNA (copy/0.1 µg)
I	A/A	17	15.7 ± 13.7	ND
II	A/B	17	22.3 ± 16.0	0.3 ± 0.3
III	B/B	3	25.8 ± 18.2	0.5 ± 0.5
IV	A/C	5	16.0 ± 12.1	8.2 ± 7.0
V	A/D or B/C	9	7.9 ± 7.8	4.8 ± 4.8
VI	B/D	1	23.8	13.3
VII	C/C	1	ND	5.3
VIII	C/D	2	ND	5.6

ループの欠損が予測されており、CES1 酵素に比べると、活性中心の Flexibility に劣る。また、CES1 酵素はオキシアニオンホールを形成する Gly¹⁴², Gly¹⁴³ に加え、141 番目のアミノ酸残基も Gly であり、Gly が 3 残基連続することで、オキシアニオンホールの形成を促進している可能性もある。このように、CES2 酵素の活性中心は立体的な障害があると同時に、遷移状態の安定性も CES1 酵素に比べて劣るため、加水分解の第 1 ステップであるアシル基と CES セリン残基との結合において、限られた大きさのアシル基しか反応できず、嵩高いアシル基を持つ基質を加水分解できないのではないかと予測している。

4. CES 活性の個人間変動

基質によってばらつきはあるものの、ヒト肝臓の加水分解活性は数倍～十数倍の個人間変動がある。ヒト CES の hCE1 および hCE2 タンパク質の変異を引き起こす SNP や、酵素発現量の変動を引き起こす 5' 上流領域の SNP が報告されている。hCE2 のタンパク質の変異として、Arg³⁴Trp, Val¹⁴²Met, Arg²⁰⁶His が報告されており⁷⁾、活性は野生型に比べると低い。いずれもアレル頻度は 0.2% である。これまでに、ヒトを対象とした検討で、ヘテロ接合

体の存在が報告されているが、エステル薬物の体内動態は野生型を有するヒトの変動範囲内である。また、最近、5' 上流域の -1548A>G は日本人に 70% の頻度で変異があると報告されたが、エステル薬物の体内動態に影響を及ぼさないことが報告されている。

一方、hCE1 にはタンパク質の変異体として、Gly¹⁸⁸Arg, Ala²⁰¹Thr, Gly¹⁴³Glu および Asp²⁶⁰fs の SNP が報告されている。Gly¹⁸⁸Arg, Ala²⁰¹Thr の活性変化に関する報告はないが、Gly¹⁴³Glu および Asp²⁶⁰fs に関しては、大きく活性が低下する⁸⁾。Asp²⁶⁰fs は触媒トライアドを形成できないために、加水分解活性は消失する。しかしながら、極めて稀な SNP であり、実例としての報告はない。また、Gly¹⁴³ はオキシアニオンホールを形成するアミノ酸であるため、Glu に変異した場合、加水分解活性が大きく低下する。Gly¹⁴³Glu のアレル頻度は Caucasian, Black, Hispanic で 3.7%, 4.3%, 2% であるが、今のところ東洋人には見つかっていない。この SNP による slow metabolizer の報告は Methylphenidate に関して、1 個人のみである。SNP とは別に、hCE1 遺伝子は非常に複雑な構造をして、発現調節されていることが最近報告された⁹⁾。Table 2 に示すように、hCE1 は第 16 番染色体上において、

5' 上流領域および exon の配列が異なる 2 種類の遺伝子が約 30 kb 隔てて、inverted duplication の状態で存在している。hCE1 をコードする遺伝子としては 4 種類あり、*CES1A1* (野生型)、酵素機能を持たない *CES1A3*、および *CES1A3* の variant である *CES1A2*、さらに、*CES1A3* と同じ 5' 上流領域および exon1 の配列をもつ *CES1A1* variant (*CES1A2* と同じ遺伝子配列) がある。それぞれの組み合わせにより、4 種のハプロタイプが存在し、9 種のディプロタイプに分類されている。*CES1A1* と *CES1A2* は signal peptide 内に 4 アミノ酸置換を生じているのみであり、同じ構造のタンパク質 (hCE1) に翻訳され、どのディプロタイプでも hCE1 タンパク質のみが発現する。Table 2 に示すように、各ディプロタイプに対する *CES1A1* と *CES1A2* の mRNA 量との関係は、55 人の肝臓サンプルにおいて、Group I から Group VI では *CES1A1* mRNA 発現量が *CES1A2* よりも高い。また、Group VII および VIII では、*CES1A2* mRNA のみが発現し、その量は少ない。*CES1A1* と *CES1A2* は同じ hCE1 タンパク質を合成するが、その発現量には個体差が大きいことが予測される。*CES1A1* の野生型と変異型のアレル頻度は欧米人で 82% および 17% であるのに対し、日本人では 75% および 25% である。また、*CES1A3* と *CES1A2* のアレル頻度は欧米人の 86% および 14% に対して、日本人では 69% および 31% という相違がある。hCE1 が何故このような複雑な遺伝子構造によって制御されているのか不明であるが、発現量の個人差・人種差の一端が解明されつつある。

また、*CES1A1* と *CES1A2* 遺伝子の基本プロモーター領域は異なっており、*CES1A1* には Sp1 と

C/EBP の結合領域が存在する。そのため、Group III や Group IV でも *CES1A1* の mRNA 発現が *CES1A2* に比べて多いのかもしれない。最近、ACE 阻害薬である Imidapril の薬理効果の個体差の研究から、*CES1A2* のプロモーター領域 -62 から -32 における 7 箇所の変異と -34 位の deletion によって、2 種のハプロタイプがそれぞれ 74% と 22% の頻度で発現することが明らかにされ、発現頻度の少ないハプロタイプには Sp1 結合部位が生じることによって、*CES1A2* の発現量が増大し、加水分解活性が増大することが報告されている¹⁰⁾。CES の SNP や発現調節に関する研究は、最近、進展しており、さらなる情報の蓄積により、エステル型医薬品の臨床応用における安全性の確保が予測可能なものになるであろう。

5. 加水分解に基づくプロドラッグの体内動態の動物種差

ヒト CES アイソザイムと異なり、動物 CES アイソザイムの個々の基質認識性は、詳細に解析されていない。しかしながら、Table 1 に示すように、小腸には主に CES2 酵素、肝臓には主に CES1 酵素および少量の CES2 酵素が存在し、げっ歯類の血漿には CES1 酵素が存在する。オセルタミビルを例に小腸と肝臓の加水分解の動物種差を見てみると、Fig. 2 に示すように、小腸 CES2 酵素ではどの動物種でも分解されず、オセルタミビルに関しては同じ認識性を示す。一方、肝臓ではヒトとサルでは加水分解されるが、ラットやイヌでは加水分解されない。肝臓には CES1 と CES2 の両酵素が発現するが、CES2 では加水分解されないため、肝臓活性は CES1 酵素の基質認識性を反映したものである。サル CES1

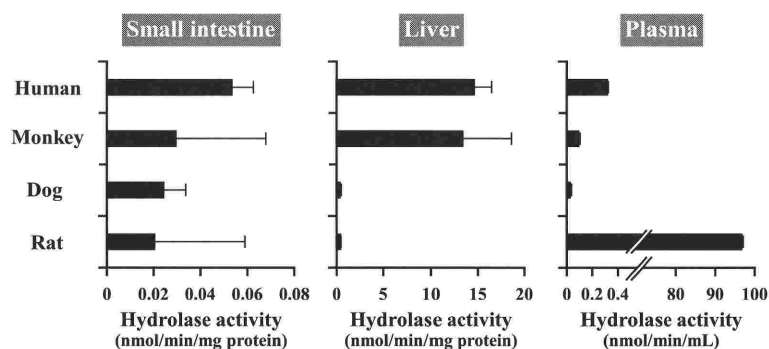


Fig. 2. Species differences in the hydrolase activities for oseltamivir between humans and the experimental animals. Hydrolase activities were determined by measuring hydrolysis of oseltamivir in the small intestine microsomes, liver microsomes, and plasma.

(MK1) は hCE1 とアミノ酸配列で 93% 相同であり、オセルタミビルだけでなく、多くの基質に対してヒトに近い認識性を示す傾向にある。イヌ肝臓にも 1 種類の CES1 酵素 (D1) が存在するが、ヒト hCE1 と 78% の相同性である。これまでの経験では、イヌ CES1 と hCE1 の基質認識性は類似することが多いが、オセルタミビルに関しては、全く異なる認識能を示した。また、ラット肝臓には 4 種類の CES1 酵素が存在し、いずれも hCE1 と約 70% 相同であるが、オセルタミビルを加水分解しない。一方、ラット血漿には、hCE1 とやはり 70% の相同性を持つ血漿 CES1 が存在し、オセルタミビルを効率よく加水分解する。この加水分解特性を反映して、オセルタミビルを経口投与後の血中濃度は、ヒトでは肝臓初回代謝のために主に活性体が血中に存在する。これに対し、ラットに経口投与した場合、血漿 CES のみの代謝では活性体への 100% の変換は得られず、尿中排泄量の 47% が活性体、15% はオセルタミビル、残りの 38% はチトクロム P450 による酸化代謝物として検出されている。

6. プロドラッグの投与部位での加水分解と バイオアベイラビリティ

オセルタミビルで示したように、プロドラッグを投与したときの活性体のバイオアベイラビリティは、全身循環に入る前の初回代謝に大きく影響され

る。投与部位が薬物のターゲット臓器である場合を除いて、投与部位での加水分解は作用の低下を招く。我々は、経口投与されたプロドラッグの小腸における加水分解が、バイオアベイラビリティにどのような影響を与えるか、Fig. 3 に示すラット single-pass 灌流実験において、小腸および血管を同時灌流することにより、小腸粘膜のみの加水分解の影響を検討している¹¹⁾。プロドラッグは腸管腔から粘膜細胞に移行すると、そのまま血管に移行するか、細胞内のエステラーゼによって加水分解されるかのどちらかの道をたどる。一般に、プロドラッグは膜透過が良好であるため、粘膜細胞内プロドラッグ濃度は高い。さらに、細胞内で生成した活性体は細胞外に比べて濃度が高く、主に、受動拡散で腸管腔および血管内に移行する。血管に移行する量が多ければ、吸収率は向上するが、活性体が腸管腔に移行（分泌）すると、プロドラッグとしての粘膜移行が増大しても、吸収率は増大しない。例えば、Propranolol の誘導体の Isovaleryl-propranolol (Isovaleryl-PL) は、ラット小腸を 1 回通過する際に 99% 以上が加水分解され、小腸で生成した Propranolol (PL) は血液中には 14% しか吸収されず、86% は腸管腔に分泌される。一方、修飾基の Isovaleric acid は腸管腔よりも、血管に約 4 倍移行する。この移行性の相違は、PL が弱塩基性薬物、Isovaleric acid が弱酸性化合物であることに起因し、pH 分配仮説に基づいた膜移

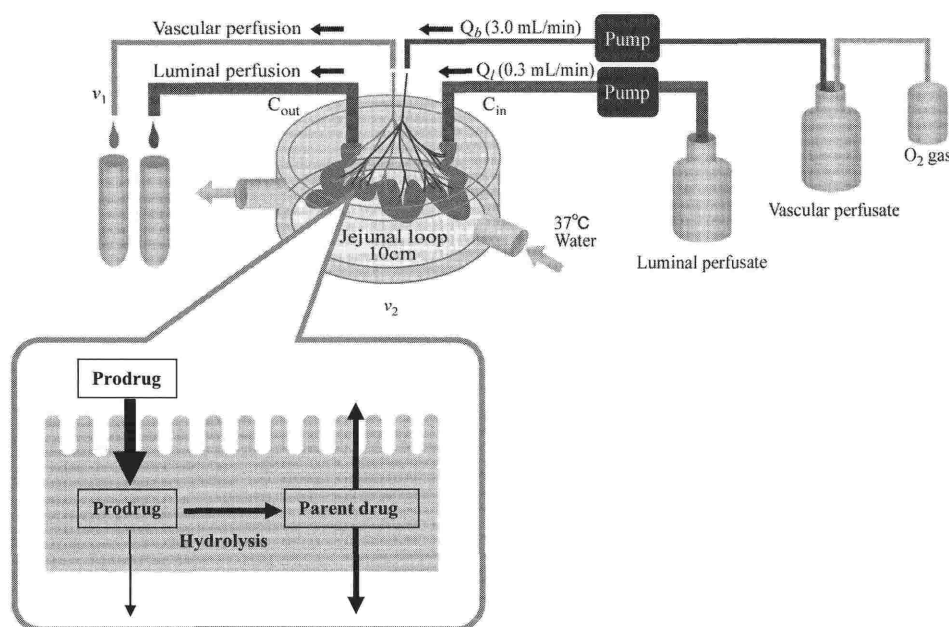


Fig. 3. Diagrammatic representation of rat jejunal single-pass perfusion.

行で説明できる。

小腸および血管の pH を両者とも 7.4 として活性体の細胞膜透過性を調べると、粘膜細胞内で生成した PL は、血管よりも腸管腔へ 4 倍移行する。また、Temocapril の場合、活性体の Temocaprilat（ジカルボン酸）は腸管腔へ 3 倍速く移行する。PL および Temocaprilat は担体輸送の可能性はなく、pH 勾配も存在しないため、この透過性の相違は、膜面積に依存するものと考えられる。すなわち、刷子縁膜側には微絨毛が存在するため、基底膜に比べて表面積が大きく、その結果、腸管腔へ移行しやすいと考えられる。同様の結果が Caco-2 細胞を用いた実験でも得られている。3~4 倍という細胞膜の面積比は、実際の膜構造から予想されるよりも小さいが、細胞骨格を形成するアクチンフィラメントの構造や細胞外マトリックスなどが分子の拡散に影響しているものと考えられる。一方、*in vivo* においては、非攪拌水層が厚く、面積比は小さくなる可能性はある。また、実際の腸管腔の pH は低いいため、活性体が酸性薬物であれば、血管への移行は増大するはずである。Temocapril の場合、活性体の Temocaprilat は腸管腔が pH 7.4 のときには腸管腔に比べて 1/3 しか血管に移行しないのに対し、腸管腔を pH 5.4 にすると、腸管腔に比べて血管に約 1.5 倍移行する。このように、弱酸性の活性体の場合には、プロドラッグが小腸上部で吸収されるときに限って、ある程度の吸収増大が見込める。しかしながら、活性体の腸管腔への移行を完全に抑制することはできず、小腸粘膜での加水分解は吸収低下をもたらすものと考えられる。

7. *In vitro* 加水分解活性による小腸吸収過程の加水分解の予測

小腸粘膜には CES 以外に多くのプロテアーゼが存在し、プロドラッグを加水分解するため、小腸で全く加水分解されないプロドラッグを設計するのは至難である。入手可能な小腸試料の中で、最も多くの構成要素を含む小腸ホモジネート 9000 g 上清 (S9) における *in vitro* 加水分解活性から、小腸吸収過程の加水分解が予測できれば、プロドラッグのスクリーニングが短時間で行える。我々は、小腸 S9 における *in vitro* 加水分解クリアランスと、*in situ* 灌流実験から得られた吸収過程の加水分解率との相

関を調べ、ある一定の関係を見出している。まだ、途中段階であるが、100 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ protein 以上の固有クリアランスを持つプロドラッグは、吸収過程で完全に加水分解され、20 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ protein の固有クリアランスのプロドラッグで約 80% が加水分解されるというデータを得ている。20 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ protein の固有クリアランスは、タンパク濃度 0.5 mg/ml の S9 で加水分解実験を行ったときに、半減期が約 1.5 時間に相当する。オセルタミビルスのラット小腸 S9 における加水分解クリアランスは 0.02 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ protein と非常に遅く、プロドラッグとして 100% 吸収される特異なプロドラッグである。*In vitro* 加水分解活性と *in situ* 加水分解率との相関図は、ヒト小腸 S9 における固有クリアランスにも当てはめることができるため、プロドラッグの小腸吸収の指標として、有用なツールになると期待している。

8. ヒト小腸上皮細胞モデル Caco-2 細胞を用いたエステル型プロドラッグの吸収性予測

Caco-2 細胞は、ヒト結腸悪性腫瘍から単離された human colon carcinoma cell line であり、薬物を経口投与後の吸収性と Caco-2 細胞透過性が良好な相関を示すため、*in vivo* での吸収を予測するための腸管上皮細胞モデルとして繁用されている。Caco-2 細胞はフィルター上で培養すると、単層膜を形成して小腸上皮細胞と同様の形態を示し、Phase I, Phase II 酵素および各種トランスポーターも発現する。Caco-2 細胞にも CES が発現するが、意外なことに、その発現パターンは Fig. 4 に示すように、ヒト肝臓と類似し、ヒト小腸とは全く異なる¹¹⁾。すなわち、通常、ヒト小腸に発現する hCE2 の発現は極めて少なく、hCE1 が高発現している。本来、ヒト結腸には小腸と同様に hCE2 が発現し、癌化あるいは cell line 化によっても hCE1 発現が顕著に増加する例は他にない。現在のところ、Caco-2 細胞における hCE1 発現の原因は不明である。

hCE1 発現を抑えて、hCE2 を高発現する細胞の作成が待たれるが、我々は、膜透過性のみを正確に評価するための Caco-2 細胞実験法を提案した。通常、プロドラッグとしては、小腸では加水分解されにくいものが開発されるため、小腸 CES による加水分解は低いはずである。そこで、Caco-2 細胞の CES 活性を特異的阻害剤、Bis-*p*-nitrophenylphos-

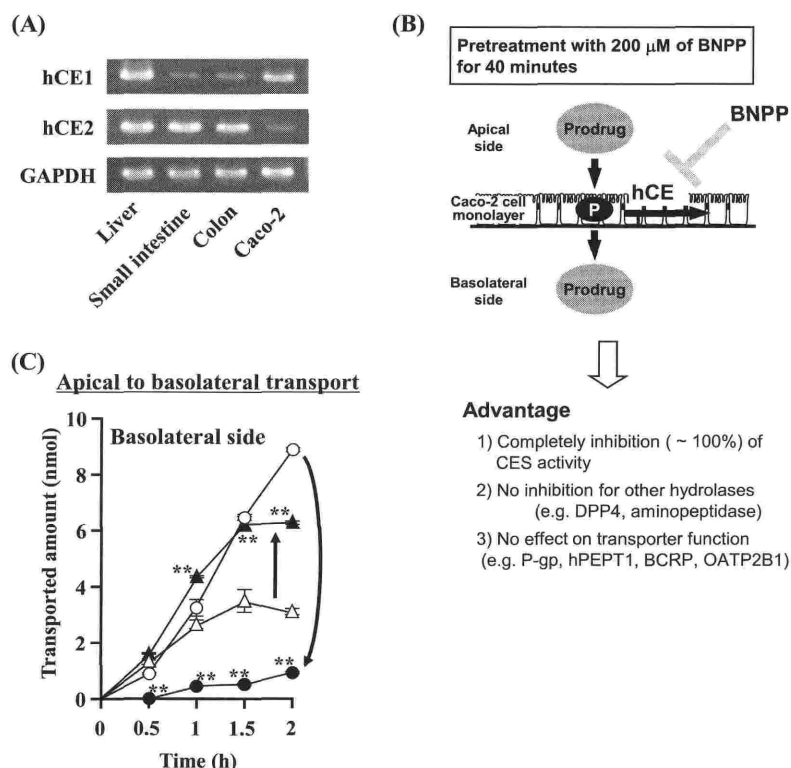


Fig. 4. Expression of CES isozymes in Caco-2 cells (A) and a novel system for estimating human intestinal absorption of prodrugs using Caco-2 cells (B) and (C).

(A) The mRNA expression levels of hCE1 and hCE2 in Caco-2 cells were analyzed by RT-PCR. (B) A novel method of evaluating the intestinal absorption of ester compounds using Caco-2 cells in the absence of esterase activity. (C) The apical to basolateral transport of 40 μ M ethyl-fexofenadine (ethyl-FXD) across Caco-2 cell monolayers with or without treatment with 200 μ M Bis-p-nitrophenylphosphate (BNPP). Circular and triangular symbols represent the transport of FXD and ethyl-FXD, respectively. Open and closed symbols represent the transport across Caco-2 cell monolayers sham-treated with transport buffer or treated with BNPP, respectively.

phate (BNPP) で阻害することによって、他の酵素、トランスポーターおよび密着結合には何ら影響しない透過実験条件を考案した。この条件下で、透過性を評価したプロドラッグとして、Ethyl Fexofenadin の例を Fig. 4 に示す。Apical に添加した Ethyl Fexofenadin は通常の Caco-2 細胞では加水分解されて、ほとんどが Fexofenadine として側基底膜側に検出されるため、吸収性は過小評価される。一方、CES 阻害条件下では、主にプロドラッグとして透過するため、正確に透過性を評価することができる。

9. プロドラッグ体内動態予測の展望

プロドラッグの体内動態を予測するためには、各臓器の加水分解活性の正確な見積もりが重要である。Fig. 5 に示すように、各臓器サンプルから固有

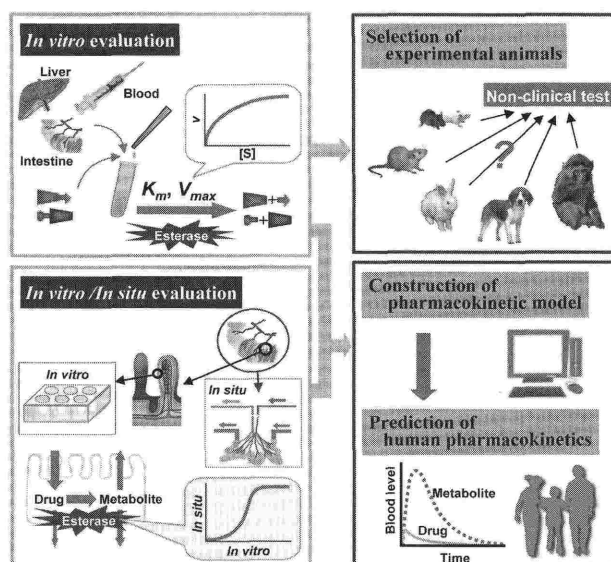


Fig. 5. Scheme of the screening of ester-type drugs by *in vitro* and *in situ* evaluation and prediction of human pharmacokinetics.

クリアランスを求め、臓器クリアランスを算出することによって、肝臓初回代謝および全身循環に移行してからの臓器加水分解を見積もることが可能である。また、小腸初回代謝は、著者らの考案する *in vitro-in situ* 相関を利用して予測し、CES 活性を阻害した Caco-2 細胞を用いて膜透過性を評価することにより、小腸吸収をできるだけ正確に予測する。これらの、吸収率、初回代謝率および臓器クリアランスを速度論的に解析することによって、体内動態の予測は可能になる。また、動物実験に際しては、ヒトの体内動態に近いと予測される動物を各臓器の加水分解データから選択することが望ましい。動物実験の結果、薬理効果なしと判定されて、開発中止になることだけは阻止したい。例えば、オセルタミビルの場合、ラットでは血漿で加水分解されるために、高投与量で薬理効果が得られるが、イヌでは薬理効果はかなり低いことが予想される。このように、動物種の選択は薬理評価においても大きな問題となるため、効果判定に用いられることのある動物種の加水分解酵素について調査することは重要である。しかしながら、サルに関しても CES 分子種の詳細は分かっていないのが現状である。

エステラーゼ研究は、発展途上と言っても過言ではない。生理的な役割を担うために、様々な種類のエステラーゼが存在し、基質の認識もオーバーラップする。エステラーゼの全貌解明にはまだまだ時間がかかるが、エステラーゼの一端がひも解かれるに従い、その生理的意義を理解した上でのドラッグデ

ザインに近づくものと期待する。

文 献

- 1) W.N. Aldridge, The esterases: Perspectives and problems, *Chem. Biol. Interact.*, **87**, 5–13 (1993).
- 2) T. Satoh, M. Hosokawa, Structure, function and regulation of carboxylesterases, *Chem. Biol. Interact.*, **162**, 195–211 (2006).
- 3) T. Imai, Human carboxylesterase isozymes: Catalytic properties and rational drug design, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**, 173–185 (2006).
- 4) T. Imai, M. Taketani, M. Shii, M. Hosokawa, K. Chiba, Substrate specificity of carboxylesterase isozymes and their contribution to hydrolase activity in human liver and small intestine, *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 1734–1741 (2006).
- 5) T. Satoh, M. Hosokawa, Carboxylesterases: Structure, function and polymorphism in mammals, *J. Pestic. Sci.*, **35**, 218–228 (2010).
- 6) A.C. Hemmert, M.R. Redinbo, A structure examination of agrochemical processing by human carboxylesterase 1, *J. Pestic. Sci.*, **35**, 250–256 (2010).
- 7) S.-R. Kim, *et al.*, Haplotypes and a novel defective allele of CES2 found in a Japanese population, *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 1865–1872 (2007).
- 8) H. Zhu, *et al.*, Two CES1 gene mutations lead to dysfunctional carboxylesterase 1 activity in man: Clinical significance and molecular basis, *Am. J. Human Genetics*, **82**, 1241–1248 (2008).
- 9) T. Fukami, *et al.*, Structure and characterization of human carboxylesterase 1A1, 1A2, 1A3 genes, *Pharmacogenet. Genomics*, **18**, 911–920 (2008).
- 10) T. Imai, M. Hosokawa, Prodrug approach using carboxylesterases activity: Catalytic properties and gene regulation of carboxylesterase in mammalian tissue, *J. Pestic. Sci.*, **35**, 229–239 (2010).
- 11) T. Imai, K. Ohura, The role of intestinal carboxylesterase in the oral absorption of prodrugs, *Current Drug Metab.*, **11**, 793–805 (2010).