

1型糖尿病ラット肝臓シトクロムP4502E1 (CYP2E1) へのバナジウム化合物の影響

片岡 小百合, 廣村 信, 安井 裕之, 桜井 弘
(京都薬科大学・代謝分析学教室*)

Effect of Insulin-mimetic Vanadyl Sulfate on Cytochrome P450 2E1 in the Liver Microsomes of Streptozotocin-induced Type 1 Diabetic Rats

Sayuri KATAOKA, Makoto HIROMURA, Hiroyuki YASUI and Hiromu SAKURAI

Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry, Kyoto Pharmaceutical University

Summary

Cytochrome P450 (P450) is a group of drug metabolizing enzymes as well as a catalyst for the conversion of chemical compounds *in vivo*. Among P450 with many types of isoforms, CYP2E1 has been reported to influence harmfully to the living system by generation of reactive oxygen species. CYP2E1 is induced in diabetes mellitus (DM) and it is known that the DM induction is improved by insulin. Then we examined the CYP2E1 contents and activity in the liver microsomes of streptozotocin-induced diabetic rats (STZ rats) treated with vanadyl sulfate (VOSO_4) and bis(6-methylpicorinate)vanadyl ($\text{VO}(\text{6mpa})_2$), that exhibit insulin-mimetic activity in place of insulin in STZ rats.

Cytochrome P450 (P450) は薬物代謝や生体内物質の変換を触媒する重要な酵素群である¹⁻²⁾。P450の多くの分子種の中でも、とりわけCYP2E1は活性酸素の生成を促すなど、生体へ悪影響を及ぼすことが報告されている³⁾。またCYP2E1は糖尿病において誘導され、インスリンにより改善されることが広く知られている²⁻⁶⁾。そこで我々はstreptozotocin (STZ) により1型糖尿病を誘発した動物に、インスリン様作用を示す vanadyl sulfate (VOSO_4) および bis(6-methylpicorinate) vanadyl ($\text{VO}(\text{6mpa})_2$)^{7,8)} を投与し、血糖値を正常化した動物におけるCYP2E1への影響を検討した。

【実験方法】

9週令のWistar系雄性ラットにSTZを35 mg/kg体重で尾静脈より単回投与し、投与後1, 2および3週間、高血糖状態を持続させた。STZ投与3週間後から、 VOSO_4 および $\text{VO}(\text{6mpa})_2$ を腹腔内投与し、血糖値を正常化させた。これらのラットから肝臓を摘出し、ミクロソーム画分⁹⁾を得た後、CYP2E1の特異的基質である *p*-nitrophenol を用いてCYP2E1の水酸化活性を評価し、またWestern blot法によりCYP2E1のタンパク質レベルを調べた。

【結 果】

1. 血糖値および体重変化

STZを単回尾静脈投与すると血糖値は翌日から上昇し、高血糖状態を1, 2および3週間持続させた。それぞれの期間における血糖値はSTZ投与後1週間で 28 ± 1.4 mM, 2週間で 32 ± 2.1 mM, 3週間では 26 ± 6.4 mMとなった。この時正常状態における血糖値は 5.3 ± 0.6 mMであった。高血糖状態を3週間持続させたSTZラットにインスリン様作用を有するバナジウムイオンおよび錯体としてそれぞれ VOSO_4 および $\text{VO}(\text{6mpa})_2$ を腹腔内投与した結果、両者ともに血糖値

*所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

は正常化した (Fig. 1(A), 1(B))。

2. 総P450およびCYP2E1 タンパク質レベル

総P450量を佐藤, 大村らの方法¹⁰⁾により定量した結果, 健常ラットと比較してSTZ投与後1週間から上昇傾向がみられ, STZ投与後3週間で有意に上昇した。一方, VOSO₄投与群およびVO(6mpa)₂投与群ではP450差の有意な減少がみられ, バナジウム化合物の投与によりP450は減少することがわかった (Fig. 2(A))。また, CYP2E1のタンパク質レベルをWestern blot法により定量した結果, 総P450量と非常に相関しており, STZ投与後3週間でCYP2E1レベルは有意に上昇し, バナジウム投与群では有意に減少した (Fig. 2(B))。

3. *p*-Nitrophenol水酸化活性 (CYP2E1 活性)¹¹⁾

Michaelis-Menten式により求めたCYP2E1活性のVmax値は健常ラットとSTZラットを比較するとSTZ投与後1週間では変化が見られなかったのに対し, 投与後2週間以降では有意な上昇がみられた。一方VOSO₄を投与すると, 上昇したSTZラットのCYP2E1活性が減少した。また, VOSO₄を投与した健常ラットのCYP2E1活性およびSTZラットのCYP2E1活性には変化が見られなかった。VO(6mpa)₂をSTZラットに投与した際のCYP2E1活性はVOSO₄と同様に減少したが, 健常ラットにVO(6mpa)₂を投与すると健常ラットと比較して少し上昇した (data not shown)。しかしVmax値を比較すると健常ラットと有意な変化がみられなかったため健常ラットにVO(6mpa)₂を投与してもCYP2E1活性はほぼ変化が見られないと考えられた (Table 1)。

4. ESR測定

調製したミクロソームのESRを測定した結果, STZラットと健常ラットのESRスペクトルには変化はみられず, P450に特有のヘム鉄 (low spin) のスペクトルのみが検出された。一方, VOSO₄およびVO(6mpa)₂投与群 (data not shown) のESRスペクトルにはP450のシグナル以外のスペクトルが検出され, これはミクロソーム中のタンパク質と結合したバナジルである可能性が高いことが予想されたため, BSAにVOSO₄を添加したESRスペクトルと比較するこ

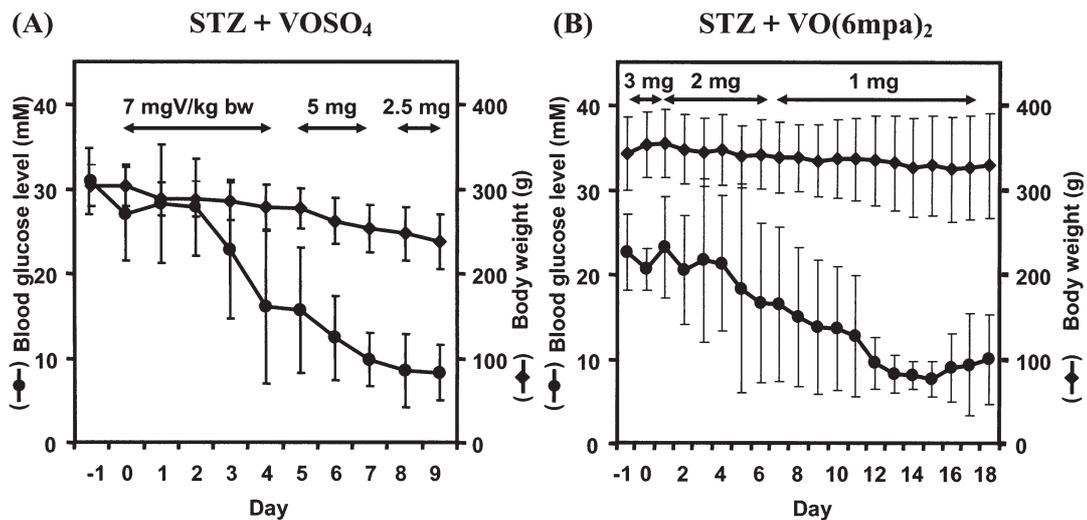


Fig. 1 Changes of blood glucose level and body weight in the VOSO₄-treated (A) and VO(6mpa)₂-treated (B) STZ rats. STZ rats at 3 weeks after STZ administration were given VOSO₄ by daily *i.p.* injections for the first to fifth of 10 days at a dose of 7 mg V/kg body weight, for the sixth to eighth days at 5 mg V/kg body weight, and then for the ninth and tenth days at 2.5 mg V/kg body weight. STZ rats at 3 weeks after STZ administration were given VO(6mpa)₂ by daily *i.p.* injections for the first day of 18 days at a dose of 3 mg V/kg body weight, for the next day to seventh days at 2 mg V/kg body weight, and then for the eighth and eighteenth days at 1 mg V/kg body weight.

◆ Body weight ● Blood glucose level

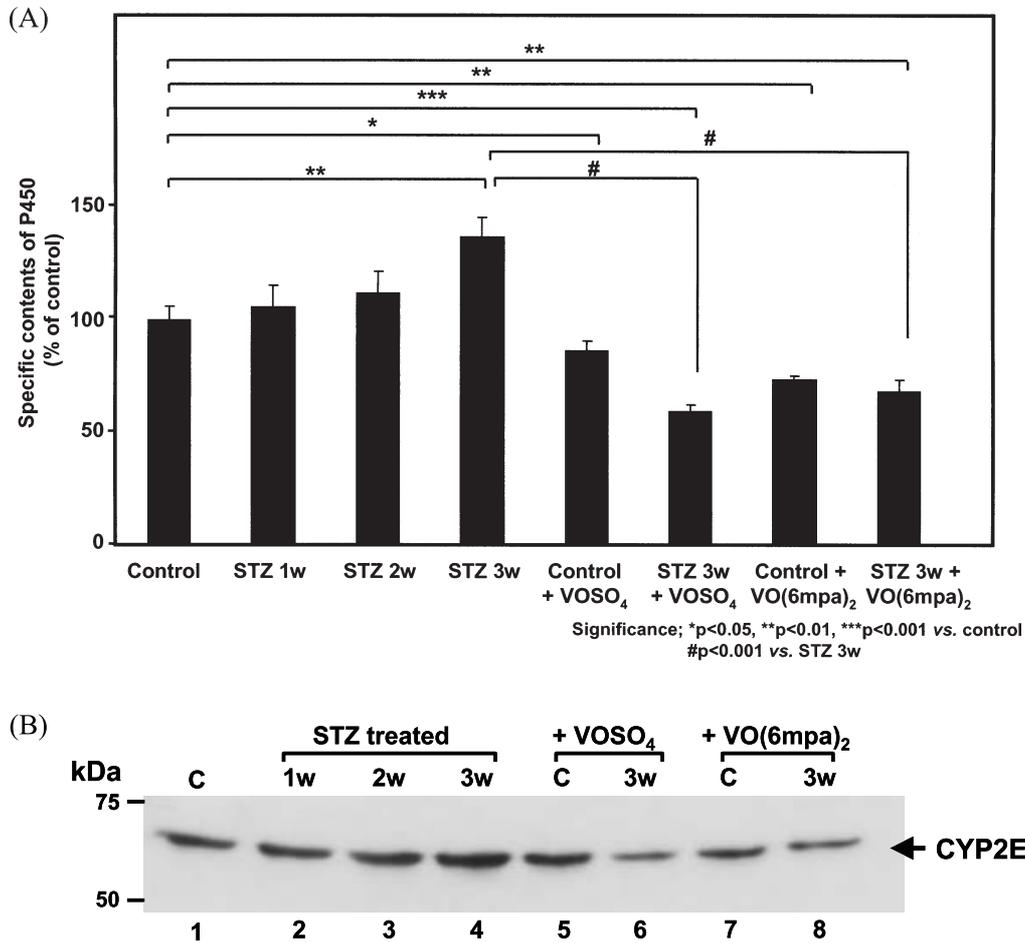


Fig. 2 Specific contents of P450 in the treated or untreated liver microsomes of rats. (A) Significance: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control. #p<0.001 vs. STZ 3w.

Protein levels of liver microsomal CYP2E1 in the untreated control, STZ and VOSO₄-treated rats (B). Lanes correspond to the following: lane 1, untreated control rats; lane 2, 3, and 4, STZ rats at 1, 2 and 3 weeks after STZ administration; lane 5 and 6, control and STZ rats treated with VOSO₄; lane 7 and 8, control and STZ rats treated with VO(6mpa)₂.

Table 1 Kinetic parameters of *p*-nitrophenol hydroxylation in the liver microsomes of rats

	Control	Period after STZ administration			cont+ VOSO ₄	STZ 3w+ VOSO ₄	cont+ VO(6mpa) ₂	STZ 3w+ VO(6mpa) ₂
		1w	2w	3w				
V _{max}	1.45 ± 0.09	1.61 ± 0.11	2.20 ± 0.09***	1.94 ± 0.15*	1.19 ± 0.04*	1.09 ± 0.14*	1.63 ± 0.10	1.22 ± 0.06*
K _m	88.7 ± 8.67	160.1 ± 51.2	129.7 ± 8.45**	81.0 ± 14.5	98.9 ± 18.3	86.3 ± 27.5	69.7 ± 7.3	82.8 ± 8.4

Significance; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control #p<0.01 vs. STZ 3w (n=3)

とした。その結果BSAにVOSO₄を添加したESRシグナルとバナジウム化合物を投与したミクロソームのESRスペクトルは非常に類似しており、投与したバナジルが肝臓へと移行しミクロソーム中のタンパク質と結合したと推定した (Fig. 3)。

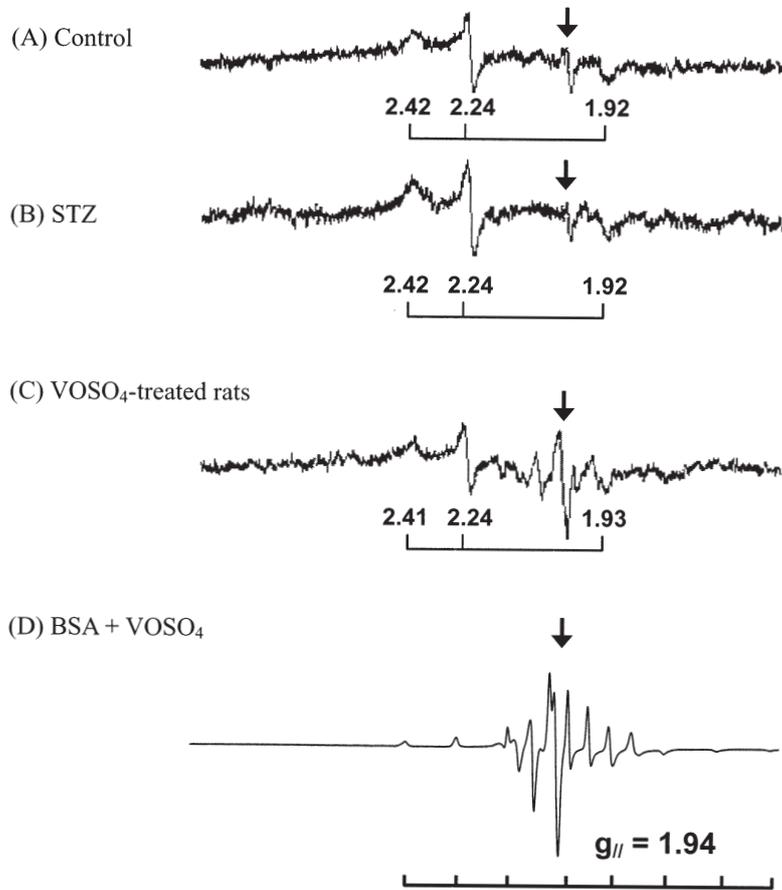


Fig. 3 ESR spectra for the liver microsomes of control rats (A), STZ rats (B), VOSO₄-treated rats and VO(6mpa)₂-treated rats (C) and the mixture of BSA and VOSO₄ (D). The spectrum for STZ rats was using the microsome of STZ rats at 1 week after administration. The spectra of VOSO₄ and VO(6mpa)₂-treated rats were those of VOSO₄-treated STZ rats. ESR spectrum was measured at liquid nitrogen temperature. ESR signal due to TCNQ-Li is indicated in the figure by the arrow (↓).

【考 察】

CYP2E1は糖尿病で増加するケトン体の代謝を担っているため、体内にこれらの化合物が増加することによるケトアシドーシスを防ぐため、つまり生体防御のために誘導したと考えられる。しかし総P450量がSTZ投与後1週間および2週間では健常ラットと有意な差が見られなかったこと (Fig. 2(A)), またCYP2E1タンパク質レベル (Fig. 2(B)) およびCYP2E1活性 (Table 1) が投与後3週間まで有意な上昇が見られなかったことから、STZを投与し血糖値は上昇しても、薬物代謝酵素が変化するには少なくとも投与後3週間を経過する必要があることがわかった。このためバナジウム化合物を投与する際には、STZ投与後3週間を経過したラットを使用したが、誘導していたCYP2E1タンパク質レベルおよびCYP2E1活性はVOSO₄およびVO(6mpa)₂の投与により有意に減少した。バナジウム化合物にはケトン体合成における律速酵素である3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthaseの阻害作用やグルコーストランスポーターであるGLUT-4の増加作用などを有していることが知られている¹²⁻¹³⁾。これらの作用によりCYP2E1により代謝されるケトン体や遊離脂肪酸が減少したことがCYP2E1活性およびタンパク質レベルの減少につながったのではないかと考えられた。

【文 献】

1. Dawson J H (1988) Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science*, 240 (4851): 433 - 439.
2. Schenkman J B, Thummel K E, Favreau L V (1989) Physiological and pathophysiological alterations in rat hepatic cytochrome P - 450. *Drug Metab Rev* 20(2 - 4): 557 - 584.
3. Tanaka E, Terada M, Misawa S (2000) Cytochrome P450 2E1: its clinical and toxicological role. *J. Clin Pharm Ther* 25: 165 - 175.
4. Haider R, Subbuswamy K P, Mari-Anne R, Nagayan G A (2004) Elevated mitochondrial cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase A4 - 4 in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 53: 185 - 194.
5. Sakuma T, Honma R, Maguchi S, Tamaki H, Nemoto N (2001) Different expression of hepatic and renal cytochrome P450s between the streptozotocin-induced diabetic mouse and rat. *Xenobiotica* 31(4): 223 - 237.
6. Lucas D, Farez C, Bardou L G, Vaisse J, Attali J R, Valensi P (1998) Cytochrome P450 2E1 activity in diabetic and obese patients as assessed by chlorzoxazone hydroxylation. *Fundam Clin Pharmacol*. 12(5): 553 - 558.
7. Thompson K H, McNeill J H, Orvig C (1999) Vanadium-containing insulin biomimetic drugs. *Top Biol Inorg Chem* 139 - 158.
8. Sakurai H, Tsuchiya K, Nukatsuka M, Sofue M, Kawada J (1990) Insulin-like effect of vanadyl ion on streptozotocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol* 126: 451 - 459.
9. Mukhtar H, Elmamloud T H, Bend J R (1978) trans-Stilbene oxide: an inducer of rat hepatic microsomal and nuclear epoxide hydase and mixed-function oxidase activities. *Chem Biol Interact* 22(2 - 3) 125 - 137.
10. Omura T, Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* 239: 2370 - 2378.
11. Koop D R (1986) Hydroxylation of *p*-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P450 isozyme 3a. *Mol Pharmacol* 29: 399 - 404.
12. Shafrir E, Spielman S, Nachliel I, Khamaisi M, Bar-On H, Ziv E. (2001) Treatment of diabetes with vanadium salts: general overview and amelioration of nutritionally induced diabetes in the *Psammomys obesus* gerbil. *Diabetes Metab Res Rev* 17(1): 55 - 66.
13. Valera A, Rodriguez-Gil J E, Bosch F, (1993) Vanadate treatment restores the expression of genes for key enzymes in the glucose and ketone bodies metabolism in the liver of diabetic rats. *J Clin Invest* 92(1): 4 - 11.