

学位論文題名

ヒト成人および胎児特異的に発現する
チトクローム P450に関する研究

学位論文内容の要旨

1. 序論

薬物代謝の中心的役割を担うチトクローム P450 のうち CYP3A 分子種は、総 P450 発現量の約 25~60% を占める主要な P450 である。

当研究室では既にヒト成人または胎児肝に常在する CYP3A4 および CYP3A7 の精製および cDNA クローニングに成功し、それらが非常に類似した一次構造を持つにもかかわらず、それぞれ成人および胎児期に特異的に発現していることを明らかにしている。しかし、CYP3A4 および CYP3A7 がそれぞれ異なった機能を有しているのか、またどのような発現調節を受けているのかについて、現在まで全く明らかにされていない。その最も大きな理由は、ヒト肝試料、特に胎児のもの入手することが極めて困難なこと、さらにその利用には倫理的な制約が伴うことからである。

そこで本研究では、胎児型 CYP3A7 を安定的に発現する培養細胞を樹立することにより、その毒性学的機能を解明することを目的とした。さらに CYP3A7 および CYP3A4 遺伝子の構造を決定し、両遺伝子の発現調節機構についても考察した。

2. 胎児型 P450 (CYP3A7) による癌原性マイコトキシンの代謝的活性化
；成人型 P450 (CYP3A4) との比較

P450 還元酵素を安定的に発現する CHL 由来細胞に CYP3A7 cDNA を導入し、これらを安定的に発現する細胞株を樹立すると共に、同様な方法で CYP3A4 cDNA を導入した細胞株も樹立し、胎児型 CYP3A7 と成人型 CYP3A4 の癌原性マイコトキシンに対する代謝的活性化能を比較検討した。AFB₁ に対する細胞致死率を指標として比較検討したところ、それぞれの P450 を高発現する培養細胞株は、ほぼ同等な感受性を持ち、その感受性は、CYP3A 活性化剤の α -NF や阻害剤の 14 員環マクロライド抗生物質の添加で、同様な上昇または低下を示した。また AFG₁ や STG に対しても両細胞は同程度の感受性を示した。これらのことから、癌原性マイコトキシンに対して、CYP3A7 は CYP3A4 と同等な代謝的活性化能を持つことが明らかとなった。

3. ヒトチトクローム b₅、b₅ 還元酵素および CYP3A7 を発現する細胞株の
AFB₁ に対する感受性

CYP3A7 発現細胞にチトクローム b₅ および b₅ 還元酵素を順次導入し、より生

体内に近い CYP3A7 発現細胞の樹立を行った。これら 3 種の酵素を同時にかつ安定的に高発現する細胞株は、AFB₁ に対して、CYP3A7 のみを発現する細胞株よりも約 2 倍の感受性を示した。したがって、ヒト肝に存在する電子伝達系をほぼ再現したこれらの細胞株は、外来性異物等に対する CYP3A7 による代謝的活性化を検討するモデル系としてさらに有用であると考えられた。

4. CYP3A7 と N-アセチルトランスフェラーゼによる癌原性アミンの代謝的活性化

CYP3A7 と第 II 相薬物代謝酵素である NAT を同時に発現させることにより、日常生活で最も身近な癌原性物質である癌原性アミンが胎児肝内で代謝的に活性化され得るかどうか検討した。P450 還元酵素とヒト NAT1 (monomorphic NAT) または NAT2 (polymorphic NAT) を安定的に発現する CHL 由来細胞に CYP3A7 発現プラスミドを導入し、CYP3A7 と NAT1、または NAT2 をそれぞれ同時に発現する細胞株を樹立した。これらの細胞は、同程度の AFB₁ 感受性を有しており、また NAT 活性も親株と同程度を維持していた。そこで代表的な癌原性アミンである IQ、MeIQ、MeIQx および 6-AC に対するこれらの細胞の感受性をコロニー形成法を用いて検討した。その結果、CYP3A7 と NAT2 を同時に発現する細胞株は、親株と比較して約 4~30 倍程度の高感受性を示した。しかし、CYP3A7 のみを発現する細胞株および CYP3A7 と NAT1 を同時に発現する細胞株は親株と同程度の感受性であった。以上のことから、癌原性ヘテロサイクリックアミンは、ヒト胎児肝においても代謝的に活性化され、それは CYP3A7 と NAT2 の両方が関与していることが示された。

5. CYP3A7 および CYP3A4 遺伝子の単離と発現調節機構

ヒトゲノムライブラリーより CYP3A4 および CYP3A7 遺伝子の単離を行い、その構造をそれぞれ決定した。

両遺伝子は共に全長約 30 kb からなり、13 個のエクソンから構成される非常に類似した構造をしていた。さらに両遺伝子のスプライス部位はすべて gt-ag 配列に従っており、エクソン長も第 1 および第 13 エクソンを除いて完全に一致していた。これらの結果より、それぞれの遺伝子は本来同一であったものが進化の過程で分岐したものであることが推察された。

CYP3A7 および CYP3A4 遺伝子の 5'-上流領域の塩基配列を解析し比較したところ、+1 から -869 までの相同性は 91.2% と非常に高かった。また、両遺伝子のプロモーター領域には多くの P450 分子種に共通して存在する BTE (basic transcription element) 配列が見られ、この領域に結合する因子がヒト胎児および成人肝核抽出液内に存在することをゲルシフトアッセイ法により確認した。さらに両遺伝子の 5'-上流には、肝特異的転写因子 HNF-4 および HNF-5 結合領域、CCAAT box (C/EBP 結合領域)、p53 結合領域などが共通に存在していた。興味深いことに、-729~-737 および -287~-296 の領域には CYP3A7 または CYP3A4 遺伝子に特異的な塩基の挿入 (HFLaSE および NFSE と命名) 領域が存在し、ゲルシフトアッセイ法により、この領域に結合する因子がヒト胎児および成人肝核抽出液内に存在することも明らかにした。

CYP3A4 遺伝子の転写活性に関与する領域を同定するために CAT アッセイを試みた。CYP3A4 遺伝子の -94~+71 までのプロモーター領域を SV40 プロモーターに置換した後、-2900 より順次欠失させた欠失変異体を CAT 構造遺伝子の 5'-上流に連結させた発現プラスミドを構築し、これらを HepG2 細胞に導入するこ

とにより CAT 活性を測定した。その結果、CYP3A4 遺伝子の 5'-上流 -445 から -245 までに 転写活性化因子が、またその上流には転写抑制因子が結合し発現調節を行っていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鎌 滝 哲 也
副 査 教 授 横 沢 英 良
副 査 助 教 授 横 井 毅
副 査 助 教 授 澤 田 均

学位論文題名

ヒト成人および胎児特異的に発現する チトクローム P450に関する研究

申請者は、ヒト成人および胎児の肝臓にそれぞれ特異的に発現するチトクローム P450 (P450) 分子種、CYP3A4 と CYP3A7 の毒性学的機能の解析と比較、および遺伝子発現機構の解明を目的として検討を行い、多くの新しい知見を得た。実験動物の胎児には P450 は存在しないがヒトの胎児にはかなりの量 (成人肝の数 10%) 存在する。したがってヒトの胎児の体内での癌原物質の代謝的活性機構などを実験動物を用いて研究し、予測することはできない。本研究は特にヒトの胎児における分子毒性学的な研究分野において高度で先端的な概念を提供するものであり、以下に詳述するように極めて優れた研究成果であると評価される。

1) ヒト CYP3A4 および CYP3A7 cDNA を導入した培養細胞系の樹立と毒性試験への応用

P450 還元酵素を安定的に発現する CHL 由来細胞に CYP3A4 cDNA を導入し、これらを安定的に発現する細胞株を樹立すると共に、同様な方法で CYP3A7cDNA を導入した細胞株も樹立し、胎児型 CYP3A7 と成人型 CYP3A4 の癌原性マイコトキシンに対する代謝的活性化能を比較検討した。AFB₁ に対する細胞致死率を指標として比較検討を行ったところ、それぞれの P450 を高発現する培養細胞株は、ほぼ同等な感受性を持ち、その感受性は、CYP3A 活性化剤 (α -ナフトフラボン) や阻害剤 (14 員環マクロライドのトリアセチルオレアンドマイシンなど) の添加で、同程度の上昇または低下を示した。またアフラトキシン B₁ と同様マイコトキシンであるアフラトキシン G₁ やステリグマトシスチンに対しても両細胞は同程度の感受性を示した。これらのことから、CYP3A4 と CYP3A7 は同等な代謝的活性化能

を持つことが明らかとなった。またこの研究によって、CYP3A7が α -ナフトフラボン添加によりその代謝的活性化能が亢進され、トリアセチルオレアンドマイシンなどの14員環マクロライド系抗生物質の添加でその機能が阻害されること、さらにアフラトキシンG₁やステリグマトシスチンも代謝的に活性化することを初めて見いだした。CYP3A7に関する研究は、本酵素がヒト胎児に特異的に発現している酵素であることなどの特殊性から世界的にほとんど研究されていない。上述の知見はしたがって極めて貴重な新知見と言える。

2) CYP3A4とCYP3A7を発現する培養細胞株へのチトクロームb5cDNAの導入

チトクローム b5はP 4 5 0分子種によって、また用いた基質によってP 4 5 0の活性を増加することが知られている。実際肝ミクロゾームにはチトクローム b5が存在することから、培養細胞にP 4 5 0を中心とする電子伝達系を再構築するにはチトクローム b5やチトクローム b5還元酵素cDNAを導入しP 4 5 0と共に同時発現することが望ましい。そこでCYP3A4とCYP3A7を発現する培養細胞にチトクローム b5 および b5 還元酵素のcDNAを順次導入し、より生体内に近いCYP3A7発現細胞の樹立を行った。これら3種の酵素を同時にかつ安定的に高発現する細胞株は、アフラトキシンB₁に対して、CYP3A7のみを発現する細胞株よりも約2倍の感受性を示した。したがって、ヒト肝に存在する電子伝達系をほぼ再現したこれらの細胞株は、外来性異物等に対するCYP3A7による代謝的活性化を検討するモデル系としてさらに有用であると考えられた。

3) CYP3A7を発現する培養細胞株へのN-アセチルトランスフェラーゼcDNAの導入

CYP3A7と第II相薬物代謝酵素であるNATを同時に発現させることにより、日常生活で最も身近な癌原性物質であるヘテロサイクリックアミンおよびアリルアミン(癌原性アミン)が胎児肝内で代謝的に活性化され得るかどうか検討した。癌原性アミンの代謝的活性化はヒト成人肝ではCYP1Aが主にその機能を果たしており、ヒト胎児肝にはCYP1Aは存在するが極めて微量であると考えられるため、これらの物質の胎児に与える影響は少ないであろうと推測されていた。本研究において、CHL細胞内にCYP3A7とNAT2を同時発現させることによって、癌原性アミンが代謝的に活性化されることを明らかにした。本研究の結果は、ヒト成人肝と胎児肝では異なった代謝的活性化メカニズムが存在する可能性があることを示唆するものである。ヒト胎児肝試料を用いた毒性試験を行うことは倫理上難しい問題があるため、今後は本研究で樹立した細胞等を利用し、より詳細に胎児毒性を予測することが可能になることが期待できる。

4) CYP3A7 および CYP3A4の発現調節機構

CYP3A7 および CYP3A4はその塩基配列やアミノ酸配列が似ているが、それぞれヒト胎児および成人に特異的に発現している酵素である。この胎児と成人特異的な発現調節機構の一端を明かにするために、先ずCYP3A7 および CYP3A4 遺伝子を単離し、その構造を比較するとともに、CYP3A4 遺伝子に関してはその転写調節に関与するエンハンサー領域の同定を行った。

CYP3A7 および CYP3A4 の一次構造を比較すると、cDNA の塩基配列で 95%、推定アミノ酸配列で 88% の相同性を持っている。しかし、両 P450 の発現時期の違いから、これらは本来同一の遺伝子であったものか、あるいは全く異なる遺伝子から同様な機能を持つ蛋白質に進化したものであるかは不明であった。本研究の結果から、CYP3A7 および CYP3A4 遺伝子は共に約 30 kb にわたり、13 個のエクソンから成る遺伝子で、エクソンおよびイントロンの長さも非常に類似していることが判明した。さらに既に単離されている他の動物種の CYP3A 遺伝子と比較しても、その構造は類似していた。したがって、CYP3A7 および CYP3A4 遺伝子は本来同一の遺伝子から、進化の過程で分岐したものであることが予測された。

次に、両遺伝子の 5'-上流領域を解析し、CAT アッセイ法を用いて、転写活性化領域の検索を行った。CYP3A7 および CYP3A4 遺伝子の 5'-上流配列を比較すると、91.2% の相同性があり、両 P450 の cDNA 配列の相同性と同程度であった。また、両遺伝子の 5'-上流領域に見られる既知の転写因子結合領域もほとんど共通して存在していたが、CYP3A7 および CYP3A4 遺伝子にそれぞれ特異的な塩基挿入領域、HFLaSE および NFSE 領域が存在することを見いだした。これらは現在まで報告されている転写因子結合領域とは異なった配列をしていた。そこでこれらの領域に結合する蛋白質因子の存在を検討したところ、成人および胎児肝核抽出液中に結合因子が存在することを見いだした。続いて、CYP3A4 遺伝子のエンハンサー領域の解析を行ったところ、-445 から -254 の領域に転写活性化領域が存在することを見いだした。この領域内には、CAAT ボックスと NFSE 領域が存在するため、これらの領域に結合する転写因子、または全く未知な因子によって、CYP3A4 遺伝子が発現の調節を受けているであろうことが推測できた。

以上、本研究ではヒト成人および胎児に特異的に存在するチトクローム P 450 の分子毒性学的研究を行い、さらにその発現調節機構について世界的にも先端的な研究を展開し、大きな成果をおさめた。本論文「ヒト成人および胎児特異的に発現するチトクローム P 450 に関する研究」に含まれる研究成果は薬学における基礎および応用のいずれにおいても優れており、博士(薬学)の学位を受けるに充分値するものと認めた。