

学 位 論 文 題 名

p 53欠損マウスの薬物代謝研究への応用

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、肝の主要な P450 である。一方、肝機能の生化学的研究に優れた *in vitro* 実験法として初代培養肝細胞が知られているが、その生存期間は数日間であり、P450 量は極めて初期に減少してしまう。長期的に P450 の発現を維持する細胞系を確立することは、薬物代謝研究を培養細胞系で行なうことを可能にし、また P450 の発現機構を解析する上で不可欠であることから薬物代謝に携わる研究者の長年の課題であった。癌抑制遺伝子である p53 を欠損させたマウスの細胞は形態を維持したまま長期培養可能なことに注目し、本研究では CYP3A を *in vitro* で研究する上で有用な培養肝細胞の確立をめざして、まず、p53 欠損マウスの初代培養肝細胞の性質を明らかにし、内因性の Cyp3a の発現について検討した。次にヒト胎児の主要な P450 である CYP3A7 を発現する肝細胞の樹立に応用し、さらに新たな試みとして p53 欠損マウスの CYP3A を高発現している初代培養肝細胞をマウス成獣の主要な CYP3A である Cyp3a-11 遺伝子の発現調節の研究に応用した。

2. p53 欠損マウスの初代培養肝細胞の性質

雄性 8 週齢の p53 欠損マウスの肝臓をコラゲナーゼ灌流後、常法により肝実質細胞を調製し、ウイリアムズ E 培地を用い、コラーゲンコートディッシュで培養した。p53 欠損マウスの初代培養肝細胞の長期培養条件をインスリン、EGF および HGF を用い検討したところ、ホモ欠損型マウスの初代培養肝細胞は増殖因子の有無にかかわらず、高い DNA 合成能を示した。p53 欠損マウスの初代培養肝細胞では培養 28 日目においても 2 核を有した細胞が単層形成し、その形態を維持していた。肝実質細胞のマーカーであり、肝細胞の癌化によって発現が消失することが知られているアルブミン mRNA はワイルド型マウスの初代培養肝細胞では培養 5 日後まで、ホモ欠損型マウスの初代培養肝細胞では培養 14 日間後まで発現していた。主要な P450 分子種である Cyp2a、Cyp2c、Cyp2e、Cyp3a および Cyp4a についてはホモ欠損型マウスの初代培養肝細胞の方が mRNA が長期に発現していた。S1 マッピングを行なった結果、長期発現していた Cyp3a は Cyp3a-11 が大部分を占めることが明らかになった。主に CYP3A が触媒する 7-プロボキシマリノ脱プロビル化酵素活性については、ワイルド型マウスの初代培養肝細胞では培養 5 日後には活性が検出できなくなったが、ホモ欠損型マウスの初代培養肝細胞では 21 日後まで活性が検出可能であった。また Cyp3a mRNA の発現と 7-プロボキシマリノ脱プロビル化酵素活性の推移は相関していた。以上 p53 欠損マウス

の初代培養肝細胞は長期培養可能で、しかも種々の P450 を長く発現しており、特に Cyp3a-11 mRNA が 2 週間後まで発現していることを明らかにした。

3. CYP3A7 を発現可能な肝細胞の樹立

ヒト胎児に発現している主要な P450 である CYP3A7 を肝細胞に導入し、安定に発現させた例はない。そこでヒト胎児 CYP3A7 の *in vitro* の研究モデルとして利用できる肝細胞の樹立を行なった。p53 欠損マウスとマウスメタロチオネインプロモーター下流に CYP3A7 cDNA を導入したトランスジェニックマウスを交配させ、p53 を欠損、かつ CYP3A7 を高発現する雌性マウス (8 週齢) を作出し、そのマウスから肝細胞を調製した。培養はコラーゲンコートディッシュを用い、常法とは異なる 2% FCS、インスリン、トランスフェリン、EGF を含む RITC 80-7 培地で 37℃、5% CO₂ 条件下で行なった。培養開始 1 ヶ月後まではほとんど細胞数に変化はなかったが、その後急激に増殖した。培養 2 ヶ月後の細胞を用いて CYP3A7 の発現を維持しているかどうかを調べた。メタロチオネインのプロモーター活性を誘導するために塩化亜鉛 (16 μM) を添加した後、48 時間後に CYP3A7 mRNA の発現が確認でき、さらに CYP3A が主に触媒する 7-プロボキシマリリン O-脱プロピル化酵素活性も検出された。また肝実質細胞のマーカーであるアルブミンを発現していた。以上、p53 欠損マウスと CYP3A7 のトランスジェニックマウスを交配し、その肝臓から CYP3A7 を発現可能な細胞株を樹立した。この方法はトランスジェニックマウスと p53 欠損マウスを交配することにより、トランスジェニックマウスに発現する酵素を培養細胞にも発現できることを示した初めての例である。

4. p53 欠損マウスの初代培養肝細胞を用いた Cyp3a-11 遺伝子の発現調節機構の解析

CYP3A を高発現し、その発現に必要な転写因子などが安定的に維持されている培養細胞は報告されてないため、p53 欠損マウスの初代培養肝細胞をマウス成獣の主要な CYP3A である Cyp3a-11 遺伝子の発現調節の研究に応用した。種々の長さの Cyp3a-11 遺伝子の 5'-上流領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に連結させた欠失変異体を作製し、リン酸カルシウム共沈澱法により細胞に導入した。36 時間培養後に細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定し、遺伝子の一過性の発現を解析した。p53 欠損マウスの初代培養肝細胞に欠失変異体を導入した方がワイルド型よりも転写活性の差が大きく見られた。Cyp3a-11 遺伝子の転写活性は -907 まで欠失させてもほとんど変化しなかったが、さらに -265 まで欠失させるとその転写活性は全長 -3000 までを含む欠失変異体で見られた値の約 5 倍に増加した。さらに -161 まで欠失させると転写活性が大幅に減少した。このことから -265 から -161 の間に転写活性化に必要な領域が存在し、-3000 から -265 の間には転写を抑制する領域が存在することが示唆された。そこで、まず転写活性化に必要であると考えられる -265 から -161 の領域に結合する核蛋白質の有無を p53 欠損マウスの肝から調製した核抽出液を用いてゲルシフトアッセイにより検討した。その結果、3 本のシフトしたバンドが確認された。非標識プローブを競合 DNA として加えた場合、これらのバンドはほとんど消失したが、配列の異なる DNA を加えたものではこれらのバンドは消失しなかった。以上のことから Cyp3a-11 遺伝子の -265 から -161 の領域に特異的に結合する核内因子が存在していることが明らかになった。

以上、薬物代謝研究に有用な CYP3A7 を発現する肝細胞の樹立と Cyp3a-11 遺伝子の発現調節機構の解析に p53 欠損マウスを応用することができた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鎌 滝 哲 也

副 査 教 授 野 村 靖 幸

副 査 助教授 徳 光 幸 子

副 査 助教授 横 井 毅

学 位 論 文 題 名

p 53欠損マウスの薬物代謝研究への応用

申請者は、p53 欠損マウスを薬物代謝研究に応用する目的で、薬物代謝の中核をなす肝細胞に焦点を絞り、初代培養肝細胞の性質を検討し、P450 の発現を長期的に維持する細胞系に発展させ、培養肝細胞株を樹立できるか否か、また p53 欠損型肝細胞が P450 の発現調節機構に適しているか否かを検討し、これら全てに成功を収めた。本研究は薬物代謝酵素、ことにその中心的な酵素であるチトクローム P450（以下 P450）の研究に有用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) p 5 3 欠損マウスの初代培養肝細胞における P450 の発現

通常、初代培養肝細胞では P450 が培養中に急激に減少し、しかも数日間しか生存できないことから、長期培養の条件を細胞増殖因子を中心に考慮し、1 ヶ月の培養に成功した。p53 欠損マウスの初代培養肝細胞の増殖は正常肝細胞同様 HGF により促進され、肝実質細胞のマーカーであるアルブミンも培養 2 週間目まで発現しており形態を維持したまま単層増殖することから、癌細胞とは異なり、正常肝細胞に近い形で 長期培養可能なことを明らかにした。

次に形態だけではなく、機能もある程度維持していることを期待し、主要な P450 分子種の発現について検討した。Cyp2a、Cyp2c、Cyp2e、Cyp3a および Cyp4a はホモ欠損型マウスの初代培養肝細胞で mRNA が長期に発現していた。特に Cyp3a-11 mRNA はホモ欠損型マウスの初代培養肝細胞では P450 分子種の中で最も長い 14 日間発現していた。肝 P450 の主要な分子種である CYP3A mRNA の長期発現に成功したのは本研究が初めてである。CYP3A は *in vivo* では CYP2C、CYP1A2 などのように肝臓に多く発現している常在型の P450 であるが、初代培養肝細胞では

その維持は困難であった。Cyp3a-11 mRNA の長期発現は血清蛋白質合成や糖新生などの肝細胞の維持と CYP3A の誘導剤の両方の利点を持ち合わせたデキサメサゾンの役割と p53 欠失によりアポトーシスが抑制されたことの両者により生じた一例である。この組み合わせがなぜ P450 の長期発現をもたらしたかについては今後の研究が期待されるところである。

2) cyp3A7 を発現する培養肝細胞株の樹立

p53 欠損マウスの肝細胞が長期に培養できることを利用し、見方を変えて外から導入した遺伝子により P450 を長期発現できないかと考え、p53 欠損マウスと CYP3A7 のトランスジェニックマウスを交配し、ヒト胎児に発現する主要な CYP3A7 を発現する培養肝細胞株の樹立に成功した。CYP3A7 により代謝される胎児毒性物質の検索や内因性の基質の研究に応用可能な細胞系として広く使用可能である。さらに、この方法はトランスジェニックマウスと p53 欠損マウスを交配することによりトランスジェニックマウスに発現する酵素を培養細胞にも発現できることを示した初めての例である。

3) p53 欠損マウスの初代培養肝細胞の P450 発現機構研究への応用

新たな試みとして、p53 欠損マウスの初代培養肝細胞が、まだ解明されていない CYP3A 遺伝子の発現調節機構の研究に応用できるかどうかを Cyp3a-11 遺伝子を例として検討した。Cyp3a-11 mRNA は p53 欠損型で長期に維持されており、Cyp3a-11 遺伝子の 5'-上流 -265 から -161 の間に、転写を活性化する領域が存在し、そこに核内因子が結合することを明らかにした。癌抑制遺伝子である p53 遺伝子を欠損したマウス自体は癌になりやすく寿命は短い。しかし癌発症前のマウスから得られた初代培養肝細胞が正常のマウスの肝細胞よりも P450 を長く維持できることを見だし、これまで報告のなかった Cyp3a を長期に渡り発現できたのは意義あることである。癌細胞から樹立された細胞よりも正常細胞の性質を有し、維持の難しい肝細胞の樹立から発現調節機構解析への有益な細胞の提供まで、薬物代謝の研究に広く応用できることを本研究では明らかにした。

以上、本研究は p53 欠損マウスの初代培養肝細胞が、P450 研究の飛躍的な発展に寄与できる有用なツールであることを見だし、世界的にもユニークな研究を展開した。分子生化学から毒性学に到る広範な分野で極めて高く評価される。本論文『p53 欠損マウスの薬物代謝研究への応用』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。