

## 学位論文題名

## ヒト CYP2A6 の遺伝的多型に関する研究: SM-12502 をプローブとして

## 学位論文内容の要旨

## 序論

薬物に対する反応性の個体差は、肝臓の薬物代謝能力の差に起因することが多い。薬物代謝能力に個体差が存在する原因として、遺伝的因子による薬物代謝の個体差によるものが最も大きな因子と考えられている。

チアゾリジン系化合物である SM-12502 は platelet activating factor (PAF) に対して *in vivo* および *in vitro* において選択的な拮抗作用を有する新規薬物である。木村らによって実施された SM-12502 の第 I 相臨床試験において、主要代謝物である S-酸化体の尿中排泄率より poor metabolizer (PM) と extensive metabolizer (EM) の存在が示唆された。本研究は本薬の代謝の個体差の原因が、SM-12502 の代謝に関わる酵素の遺伝的多型にあると予想し、代謝酵素を同定し、同定した代謝酵素の遺伝子を解析し、最終的には代謝酵素の遺伝的多型の遺伝子診断法を開発することを目的とした。その結果、SM-12502 の代謝に CYP2A6 が主に関与すること、SM-12502 の代謝における PM と EM の個体差の原因は CYP2A6 遺伝子の欠損にあること等を明らかにし、数多くの新しい知見を得た。

## 第 I 章 酵母で発現したフラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO1) による SM-12502 の代謝

SM-12502 の主代謝経路が S-酸化であることから、まず SM-12502 が FMO の新しい基質となり得るかについて、FMO の主要な分子種の一つである FMO1 を発現している形質転換酵母のマイクロゾームを用いて検討した。その結果 FMO1 は SM-12502 の S-酸化反応を触媒することを明らかにした。さらに、蛇足ながら S-酸化反応を触媒する FMO1 の特性を利用し、S-酸化体のみが経時的に培養液上清中に産出されるバイオリアクターとしての適用が可能であることを示した。すなわち、FMO1 を発現している形質転換酵母はスルフォキシド基を有する化合物の大量生産の簡便な手段になりうることを明らかにした。

## 第 II 章 ヒト肝 Ms による SM-12502 の代謝

ヒト肝マイクロゾームにおいて、SM-12502 の S-酸化反応に関与する酵素を検討した。ヒト肝マイクロゾームにおいて、SM-12502 の S-酸化反応には FMO ではなく CYP が関与していることを明らかにした。さらに、SM-12502 の S-酸化酵素活性はクマリンおよび抗ラッド CYP2A2 抗体によりそれぞれ約 80%、70% 阻害され、20 検体のヒト肝マイクロゾームにおいて各 CYP 分子種含量と S-酸化酵素活性の相関係数は、CYP2A6 においてのみ有意な値 ( $r = 0.808, p < 0.0005$ ) を示した。SM-12502 の S-酸化反応における CYP2A6、CYP2B6、FMO1 の  $K_m$  値および 3 検体のヒト肝マイクロゾームにおける  $K_m$  値から考慮すると、ヒトにおいては高親和性の酵素として CYP2A6 が、低親和性の酵素として CYP2B6 または FMO1 が SM-12502 の S-酸化反応に関与していることを明らかにした。実際に臨床用量の SM-12502

を投与した時の肝臓中濃度は、最大血中濃度の数倍と仮定した場合、数  $\mu\text{M}$  ～ 数十  $\mu\text{M}$  と考えられることから、臨床用量の SM-12502 をヒトに投与した場合、CYP2A6 のみが SM-12502 の代謝に関与することを明らかにした。

### 第 III 章 ヒト肝試料における *in vitro* SM-12502 代謝多型の解析

ヒト肝試料における *in vitro* SM-12502 代謝多型を解析した結果、*in vitro* SM-12502 代謝試験で PM と考えられた H16 の検体は CYP2A6 蛋白および CYP2A6 mRNA を発現しておらず、従来報告のなかった 2.6 kb のフラグメントが欠損した新しい Sac I-RFLP であることを示し、本研究で D タイプと命名した。この Sac I-2.6 kb のフラグメントは CYP2A6 遺伝子のイントロン 5 よりエクソン 9 までの領域を含んでいた。また、PCR-RFLP 法より、D タイプは CYP2A6 遺伝子のエクソン 8 の領域を欠損していた。以上より、D タイプは CYP2A6 遺伝子を部分的に欠損しており、そのため、CYP2A6 mRNA および CYP2A6 蛋白が発現しない結果、CYP2A6 酵素活性を示さないことを明らかにした。

### 第 IV 章 *In vivo* SM-12502 代謝多型の原因となる CYP2A6 遺伝子欠損の解析

日本人 28 名のうち第 I 相臨床試験で PM と判定された 3 名の末梢血ゲノム DNA を用いて、6.4、4.5、2.6 kb のフラグメントが欠損した新しい Sac I-RFLP (本研究で E タイプと命名) であることを見だし、SM-12502 代謝における PM と EM の個体差の原因は CYP2A6 遺伝子の欠損であることを明らかにした。Sac I サザンブロット分析および PCR-RFLP を用いて CYP2A6 遺伝子欠損の新しい診断法を確立し、132 名の日本人における CYP2A6 遺伝子のホモ欠損者は、4.5% であることを明らかにした。

#### まとめ

SM-12502 代謝の個体差の原因を解明するため研究を進めた結果、以下の知見を得た。

- 1) SM-12502 代謝には、CYP2A6 が主に関与していることが示唆された。
- 2) PM の原因である D、E タイプは CYP2A6 遺伝子を欠損していた。
- 3) *In vivo* SM-12502 代謝における PM と EM の個体差の原因は CYP2A6 遺伝子の欠損であることを明らかにした。132 名の日本人において、CYP2A6 遺伝子のホモ欠損者は、4.5% であった。
- 4) Sac I サザンブロット分析および PCR-RFLP を用いて CYP2A6 遺伝子欠損の診断法を確立した。

従って、今後 SM-12502 の代謝能を本研究で確立した Sac I サザンブロット分析および PCR-RFLP を用いて CYP2A6 遺伝子欠損をあらかじめ判定しておけば、患者の代謝能に応じた安全で最も効率の良い SM-12502 の利用 (いわゆる匙加減) ができるようになるものと期待される。また、薬物が CYP2A6 により代謝されるかについて第 II 章で述べた方法により検討し、CYP2A6 により代謝されるのであれば、今回確立した方法により CYP2A6 遺伝子欠損について診断し、薬物代謝能の個体差による副作用を未然に防ぐことができるという一つの方法論を確立した点でも、本研究は非常に意義があると思われる。

# 学位論文審査の要旨

|    |     |   |   |   |   |
|----|-----|---|---|---|---|
| 主査 | 教授  | 鎌 | 滝 | 哲 | 也 |
| 副査 | 教授  | 長 | 澤 | 滋 | 治 |
| 副査 | 助教授 | 高 | 橋 | 和 | 彦 |
| 副査 | 助教授 | 横 | 井 |   | 毅 |

## 学位論文題名

### ヒト CYP2A6 の遺伝的多型に関する研究:SM-12502をプローブとして

申請者は前臨床試験で認められた SM-12502 の動態における個体差の原因を解明するため研究を進め、この個体差が本薬の代謝を触媒する酵素の遺伝的な多型に由来することを初め、薬物代謝酵素の新しい遺伝的多型と、原因遺伝子の解析して明らかにするなど新規な研究を展開した。本研究は薬物の有効性と安全性に関する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) SM-12502 のフラビン含有モノオキシゲナーゼ(FMO)による代謝

まず、SM-12502 の主代謝経路が S-酸化反応であることから、SM-12502 が FMO の新しい基質となり得るかについて、FMO の主要な分子種の一つである FMO1 を発現している形質転換酵母のマイクロゾームを用いて検討した。その結果 FMO1 は SM-12502 の S-酸化反応を触媒することを明らかにした。さらに、蛇足ながら S-酸化反応を触媒する FMO1 の特性を利用し、この形質転換酵母が S-酸化体のみを経時的に培養液上清中に産出するバイオリアクターとして適用できることを示した。すなわち、FMO1 を発現している形質転換酵母はスルフォキシド基を有する化合物を大量に生産する触媒として用いることができることを明らかにした。

#### 2) ヒト肝ミクロによる SM-12502 の代謝

SM-12502 の S-酸化反応を触媒する酵素を、ヒト肝マイクロゾームを用いて検討し、SM-12502 の S-酸化反応には FMO ではなく CYP が主に関与していることを明らかにした。さらに、SM-12502 の S-酸化酵素活性はクマリンおよび抗ラット CYP2A2 抗体によりそれぞれ約 80%、70% 阻害され、20 検体のヒト肝マイクロゾームを用いた検討から、CYP2A6 と S-

酸化酵素活性の相関係数は、 $r = 0.808$  ( $p < 0.0005$ )であり、CYP2A6 が SM-12502 の S-酸化酵素である可能性を示した。SM-12502 の S-酸化反応における発現酵素、CYP2A6、CYP2B6、FMO1、の  $K_m$  値およびヒト肝ミクロゾームを用いた研究から得られた  $K_m$  値から考慮すると、ヒトにおいては高親和性の酵素として CYP2A6 が、低親和性の酵素として CYP2B6 または FMO1 が SM-12502 の S-酸化反応に関与していることを明らかにした。臨床用量の SM-12502 をヒトに投与した場合、CYP2A6 のみが SM-12502 の代謝に関与すると考えられた。

### 3) ヒト肝を用いた SM-12502 代謝における多型の原因遺伝子の解析

ヒト肝試料を用いてその *in vitro* SM-12502 代謝における多型を解析した結果、*in vitro* SM-12502 代謝試験で PM と考えられた H16 の検体には CYP2A6 蛋白および CYP2A6 mRNA が発現しておらず、従来報告のなかった 2.6 kb のフラグメントが欠損した新しい Sac I-RFLP であることを示し、本研究で D タイプと命名した。この Sac I-2.6 kb のフラグメントは CYP2A6 遺伝子のイントロン 5 よりエクソン 9 までの領域を含んでいた。また、PCR-RFLP 法より、D タイプは CYP2A6 遺伝子のエクソン 8 の領域を欠損していた。以上の結果から、D タイプは CYP2A6 遺伝子を部分的に欠損しており、そのため、CYP2A6 mRNA および CYP2A6 蛋白が発現しない結果、CYP2A6 酵素活性を示さないことを明らかにした。

### 4) SM-12502 の体内動態で異常を示したヒト末梢血を用いた遺伝子解析と遺伝子診断法への応用

日本人 28 名のうち第 I 相臨床試験で PM と判定された 3 名の末梢血ゲノム DNA を解析し、6.4、4.5、2.6 kb のフラグメントが欠損した新しい Sac I-RFLP (E タイプと命名) であることを見だし、SM-12502 代謝における PM と EM の個体差の原因は CYP2A6 遺伝子の欠損にあることを明らかにした。Sac I サザンブロット分析および PCR-RFLP を用いて CYP2A6 遺伝子欠損の新しい診断法を確立し、132 名の日本人における CYP2A6 遺伝子のホモ欠損者は、4.5% であることを明らかにした。本研究で CYP2A6 遺伝子欠損の遺伝子診断も可能にした。

薬物代謝能の個体差による副作用を未然に防ぐことができるという一つの方法論を確立した点でも、本研究は非常に意義があると思われる。

以上、本研究では SM12502 をツールとし CYP2A6 の遺伝的多型とその遺伝子診断法の確立を成し遂げた。本論文『ヒト CYP2A6 の遺伝的多型に関する研究：SM-12502 をプローブとして』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。