

学位論文題名

Transgenic Mice Carrying a Human Fetus-specific CYP3A7 Gene: Establishment, Characterization, and Application to Drug Metabolism and Toxicological Study

（ヒト胎児期特異的なチトクローム P 450 3A 7 の毒性学的な役割：
トランスジェニックマウスを用いた研究）

学位論文内容の要旨

1. はじめに

チトクローム P450 (P450 または CYP) は様々な生体外異物の代謝に関与することが知られている。P450 は現在までにその一次構造の比較から super gene ファミリーを形成しており、これらの中で CYP3A サブファミリーはヒトおよび実験動物の肝に存在する最も主要な分子種であり、総 P450 含量の約 30% を占めている。CYP3A により代謝される化学物質は非常に多く、カルシウム拮抗薬、免疫抑制薬、抗癌薬および発がん物質のアフラトキシン B₁ (AFB₁) 等広範囲に渡っている。

CYP3A7 は当研究室においてヒト胎児肝から単離・クローニングし、その分子種はヒト胎児期に特異的に発現することを明らかにした分子種である。しかし、CYP3A7 の薬理学的な機能、とりわけ毒性学的な役割の詳細は現在まで不明である。そこで著者は CYP3A7 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用い、*in vivo* における CYP3A7 の毒性学的な機能、特に AFB₁ の代謝的活性化および薬物の代謝における役割を検討した。

2. CYP3A7 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの樹立

CYP3A7 cDNA の全長を含んだプラスミド pM56 をマウスのメタロチオネインプロモーター (MT-I) に挿入して発現プラスミド pM74 を構築した。この pM74 を *Pvu*I で消化した断片 (5.4 kb) を導入遺伝子としてマウスの受精卵前核へマイクロインジェクション法で注入し、トランスジェニックマウスを作出した。108 匹の BDF₁ 系 founder マウスのうち 27 匹（雄性 13、雌性 14）において導入遺伝子を、PCR およびサザンブロット解析で確認した。Founder マウスと C57BL/6N 系マウスを交配させることにより、六系統のトランスジェニックラインを樹立した。導入遺伝子のコピー数は 1 個から数 100 個であった。

3. 導入遺伝子の発現および臓器分布

F1, F2 マウスを用いて導入遺伝子の mRNA およびタンパクレベルでの発現を検討した。その結果、M10 系のみが肝発現型であった。これに対し、腎臓には M10 系を除いて全ての系で発現していた。また、全ての系において性巣で導入遺伝子 mRNA が発現していた。さらに、抗 CYP3A7 抗体を用いたウエスタンブロット分析により、CYP3A7 タンパク質の発現を検討したところ、M10 系マウスの肝および性巣においてタンパク質の発現が認められた。また、M2 系マウス腎臓において導入遺伝子のタンパク質発現も確認した。

4. 臓器重量およびホルモン類の血中濃度

M10系マウスの成長に伴う各臓器重量の変化およびテストステロン等のホルモン類の血中濃度を検討した。その結果、雄性マウスの肝および腎臓、雌性マウスの腎臓および子宮の肥大が確認されたのに対し、性巣の有意な萎縮が観察された。さらに、テストステロンの血中濃度が有意に高かった。

5. 導入遺伝子の胎仔期から新生仔期における発現

M10系マウスについて妊娠13日目から生後2週間にわたる胎仔または新生仔の肝における導入遺伝子の発現を検討した。その結果、導入遺伝子は妊娠14日目から発現し始め、生後2週間まで高い発現レベルを維持していることが示された。その発現パターンは妊娠15日目から出生前後まで徐々に上昇し、生後3日目に急激に増加し、10日目に一時的に減り、14日目に再び増加した。また、CYP3A7のタンパク質の発現も認められた。さらに、CYP3A特異的な基質であるミダゾラムを用い、14日齢新生仔肝ミクロゾームにおいてミダゾラム1'-位水酸化酵素活性を確認出来た。

6. ミダゾラムの*in vivo* および*in vitro* における代謝

8週齢のM10系とM2系マウスを硫酸亜鉛で一週間誘導した後、ミダゾラムを2 mg/kg 体重で腹腔内単回投与した。投与30分後マウスの血清中ミダゾラムの代謝物レベルをHPLCで測定した。その結果、ミダゾラムの1'-位水酸化代謝物(1'-OH-MZ)のレベルはノントランスジェニックマウスと比べ、M10系マウスにおいて有意に高かった。

さらに、M10系マウス肝ミクロゾームを用い、ミダゾラム1'-位水酸化の速度論的解析を行ったところ、M10系マウスにおいてはノントランスジェニックマウスと比べ、有意に高い V_{max} が認められた。一方、 K_m の値はノントランスジェニックマウスとほぼ同様であった。

7. AFB₁ の*in vivo* における代謝的活性化

8週齢M10系とM2系マウスにAFB₁ (4 mg/kg 体重)を腹腔内投与し、AFB₁-DNA付加体(AFB₁-Gua)を指標として、トランスジェニックマウスにおける肝および腎臓のAFB₁-Guaレベルを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて検討した。その結果、肝および腎臓にCYP3A7を発現しているM10系トランスジェニックマウスにおいてはノントランスジェニックマウスに比べ、肝において有意に高いAFB₁-Guaレベルが認められた。また、腎臓にCYP3A7を発現しているM2系マウスでは腎臓で有意に高いAFB₁-Guaレベルが検出された。

さらに、アルカリ溶出法でマウス肝および腎臓のDNA損傷を検討した。その結果、ノントランスジェニックマウスと比べ、M10系マウスにおいては肝DNAの損傷が、M2系マウスにおいては腎臓DNAの損傷が有意に高かった。

M2系およびM10系マウスにおいてglutathione S-transferase(GST)酵素が正常に発現しているかどうかを確認するためにノーザンブロット分析を行い、GSTがノントランスジェニックマウスと同様に発現していることを確認した。また、CDNB (1-chloro-2,4-dinitro-benzene)を用いGST酵素活性を測定した結果、ノントランスジェニックマウスと比較し、M2系およびM10系マウスにおいてほぼ同様な活性が認められた。これらのことから、M2系およびM10系トランスジェニックマウスはヒトCYP3A7遺伝子の導入によりAFB₁に対する感受性が高くなることが強く示唆された。

8. まとめ

ヒト胎児特異的なCYP3A7遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを樹立し、CYP3A7の毒性学的機能および薬物代謝酵素としての役割を検討し、以下の知見を得た。

- 1) CYP3A7導入遺伝子はマウスの胎仔期から新生仔期にかけて発現しており、ミダゾラムの水酸化酵素活性を有することを確認した。
- 2) CYP3A7導入遺伝子を発現させ、*in vivo* におけるミダゾラムの水酸化酵素を有することを確認した。
- 3) CYP3A7導入遺伝子を発現させ、*in vitro* および*in vivo* におけるAFB₁の代謝的活性化能を示した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	鎌 滝 哲 也
副査	教授	上 野 直 人
副査	助教授	渋谷 浩 司
副査	助教授	横 井 毅

学 位 論 文 題 名

Transgenic Mice Carrying a Human Fetus-specific CYP3A7 Gene: Establishment, Characterization, and Application to Drug Metabolism and Toxicological Study

(ヒト胎児期特異的なチトクローム P 450C₃A₇ の毒性学的な役割:

トランスジェニックマウスを用いた研究)

チトクローム P 450 は主として肝ミクロゾームに存在し薬物や毒物などの解毒的代謝や代謝的活性化を触媒する酵素である。胎児に存在するチトクローム P 450 は母胎から摂取された薬物などの生体外異物を代謝すると考えられる。ヒトの胎児の肝臓にはチトクローム P 450 が存在するものの、ラットなど実験動物の胎仔には存在しないので、ヒトの胎児に存在するチトクローム P 450 の薬理学的・毒性学的な機能の研究は遅れていた。

本研究ではヒトの胎児に存在するチトクローム P 450 の内でも主要な分子種である CYP3A7 の機能に関する研究を中心に研究を行い、数々の新知見を得た。本研究はヒト胎児の薬理学的・毒性学的機能に関し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) CYP3A7 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの樹立

CYP3A7 をコードする cDNA 全長を含んだプラスミド pAM56 をマウスメタロチオネインプロモーター (MT-1) に挿入して、発現プラスミド pAM74 を構築した。このプラスミドを pvu I で消化して得られた断片をマウスの受精卵前核へ注入し、トランスジェニックマウスを作出した。導入遺伝子は PCR およびサザンブロット分析で確認した。

2) 導入遺伝子の発現および臓器分布

CYP3A7 の発現を mRNA および蛋白質のレベルで調べた。M2 系のマウスでは

腎臓を初め多数の臓器に CYP3A7 の mRNA や蛋白質が発現していた。一方、M10 系のマウスには肝臓といくつかの臓器で CYP3A7 が発現していた。M10 系のマウスは肝臓に CYP3A7 が発現している点で特徴的であった。

3) CYP3A トランスジェニックマウスの臓器重量およびホルモン類の血中濃度

M10 マウスの各臓器重量とホルモンの血中濃度を測定した。その結果、優勢マウスの肝および腎臓、雌性マウスの腎臓および子宮の肥大が認められ、また、精巣の有意な萎縮が観察された。さらに、テストステロンの血中濃度が有意に高かった。

4) 導入遺伝子の胎児期および新生仔期における発現

CYP3A7 導入遺伝子は妊娠 14 日目から発現し始め、生後 2 週間まで高いレベルを維持していた。正確には妊娠 15 日目から出生前後まで徐々に上昇し、生後 3 日目に急激に増加し、10 日目に一時減り、14 日目に再び増加した。

5) ミダゾラムの *in vivo* および *in vitro* における代謝

8 週齢の M10 系マウスと M2 系マウスに硫酸亜鉛を投与して誘導処置後、ミダゾラムを 2mg/kg 体重の割合で腹腔内に単回投与した。投与 30 分後マウスの血清中ミダゾラムの代謝物レベルを HPLC で定量した。その結果、ミダゾラムの 1'-位水酸化代謝物 (1'-OH-MZ) のレベルはノントランスジェニックマウスと比べ、M10 系マウスにおいて有意に高かった。

6) アフラトキシン B₁ (AFB₁) の *in vivo* における代謝的活性化

8 週齢 M10 系および M2 マウスに AFB₁ (4mg/kg) を腹腔内投与し、AFB₁-DNA 付加体 (AFB₁-Gua) を指標として、トランスジェニックマウスにおける肝および腎臓の AFB₁-Gua レベルを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて検討した。その結果、肝に高い CYP3A7 の発現が見られる M10 系マウスでは肝に、腎に高い CYP3A7 の発現が認められる M2 系のマウスでは腎臓に高い AFB₁-Gua レベルが検出された。さらに、アルカリ溶出法でマウス肝および腎臓の DNA 損傷を検討した。その結果、M10 系マウスにおいては肝 DNA の損傷が、M2 系マウスでは腎臓で有意に高い DNA 損傷が認められた。

以上の結果から、ヒト胎児チトクローム P 450 である CYP3A7 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスは薬物の代謝やがん原物質の代謝的活性化を示し、ヒト胎児において同様の薬理学的・毒性学的機能を持つことが推定された。

以上、本論文はヒト胎児に特異的に発現している CYP3A7 の薬理学的・毒性学的機能を CYP3A7 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作出する事により研究した。本論文『Transgenic Mice Carrying a Human Fetus-Specific CYP3A7 Gene: Establishment, Characterization, and Application to

Drug Metabolism and Toxicological Study』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。