

学位論文題名

ヒト CYP2E1 遺伝子導入によるがん原・異変原物質 に高感受性な細胞株の樹立とその毒性学的应用

学位論文内容の要旨

環境中に存在する化学発がん物質の多くは、まずチトクローム P450(以下 P450 もしくは CYP)に代表される生体外異物代謝酵素(薬物代謝酵素)によって、化学的に反応性の高い活性代謝物へと代謝的に活性化される。この反応性の高い活性代謝物は DNA と結合し、付加体(DNA adduct)を形成する。これが DNA 複製の際、障害となり遺伝子上に突然変異(塩基置換や欠失、挿入など)を誘発する。これら遺伝子損傷のほとんどは様々な DNA 修復酵素によって修復されると考えられる。しかし、修復が行われない場合、細胞増殖に伴う2回目の複製の際に遺伝子の変異が固定されてしまう。従って化学発がんの過程においては、薬物代謝酵素による代謝的活性化と DNA 修復酵素による DNA の修復の過程はヒトにおける発がん感受性(発がんリスク)に大きく寄与していると考えられる。従来、開発中の薬物、食品添加物、農薬、環境汚染物質等のヒトにおける発がん性を評価する試験系として、様々な変異原性試験が行われているが、これらの試験に用いられる試験菌株や培養細胞株のほとんどは代謝的活性化を担う薬物代謝酵素活性が著しく低下しているかあるいは全く欠損している。こうした欠点を補うために、従来は薬物代謝酵素が含まれるラット肝臓のポスト・ミトコンドリア画分からなる酵素系(S9 mix)を培地中に添加しているが、以下のような問題点が存在する。第一点は代謝的活性化にラット肝 S9 mix を用いているが、薬物代謝酵素には質的、量的にも動物種差が存在し、必ずしもラット肝 S9 mix を用いて得た結果をヒトに外挿できないという点である。第二点として、がん原物質の代謝的活性化を細胞外で行うため、反応性の高い活性代謝物は膜に結合して透過せず、細胞内のタンパク質や核酸まで到達できないため、結果的に変異原性や毒性が低く見積もられる可能性がある。第三点として S9 mix は様々な酵素の混合物であるため、代謝的活性化の詳細なメカニズムの解明が困難なことである。本研究においては、これら従来の試験系における欠点を補い、ヒトにおける発がんリスクを予測し得る試験系の開発を目指し、ヒトの薬物代謝酵素を培養細胞内や大腸菌内に発現させることを目的とした。第 I 章においてはヒト CYP2E1 を変異原性試験に汎用される細胞株であるチャイニーズハムスター線維芽細胞へ発現させることを目的とし、実際に細胞毒性試験に適用できるか否かを検討した。第 II 章においてはヒト細胞への適用と変異原物質のさらなる高感化を目指し、DNA 修復酵素の一つである O⁶-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ(MGMT)を欠損するヒト HeLa 細胞内でのヒト CYP2E1 の発現を検討した。最後に第 III 章では DNA 修復酵素を欠損している変異原性試験菌株である大腸菌 WP2 uvrA 株においてヒト CYP2E1 を大量発現させることによるさらなる高感度化を目指した。

第 I 章では、変異原性試験に汎用されるチャイニーズハムスター線維芽細胞由来でモルモット OR を安定的に発現する CR-119 株にヒト CYP2E1 cDNA を導入し、両酵素を安定的に発現する ER-181 株を樹立した。コロニー形成率を指標とした細胞毒性試験を行ったところ、ER-181 株は親株である CR-119 株と比較してがん原性ニトロソアミンである NDMA に高感受性を示した。また、6-チオグアニン抵抗性を指標とした突然変異誘発試験を行ったところ、ER-181 株において NDMA による変異原性も観察された。以上、OR を安定的に発現する細胞株にヒト CYP2E1 cDNA を導入により、従来その変異原性の検出が困難であったがん原性ニトロソアミンに対して高感受性な細胞株の樹立に成功し、がん原物質の代謝的活性化に担う薬物代謝酵素を培養細胞で安定的に発現させることによって、それら化合物を高感度に検出できる試験系を開発することが可能であることを明らかにした。

第 II 章では、さらにがん原性ニトロソアミンに対して高感受性を示す試験系の開発を目指し、DNA 修復酵素のひとつである MGMT を欠損する細胞株へヒト CYP2E1 を導入した。がん原物質によって損傷を受けた DNA はそのほとんどが DNA 修復酵素により修復されていると考えられる。そこで DNA 修復酵素欠損株へヒト CYP2E1 cDNA の導入を試み、未修復の DNA の割合を増加させることにより高感受性を示す試験系の開発を目指した。アルキル化された DNA の修復を担っている MGMT を欠損する HeLa S3 Mer-株および MGMT を有する AC1-6 株へヒト CYP2E1 を導入し、ほぼ同レベルのヒト CYP2E1 を安定的に発現する細胞 ME-17、AE-5 株を樹立した。これらの細胞株についてコロニー形成率を指標として細胞毒性試験を行ったところ、ヒト CYP2E1 を導入した ME-17、AE-5 株においてがん原性ニトロソアミンである NDMA に対して感受性の上昇がみられ、特に DNA 修復酵素である MGMT を欠損する ME-17 株において著しく感受性が上昇していた。また 6-チオグアニン抵抗性を指標とした突然変異誘発試験を行ったところ ME-17 株においてのみ、NDMA による明らかな突然変異の誘発が認められた。以上、MGMT を欠損する HeLa S3 Mer-株にヒト CYP2E1 を導入することによりがん原性ニトロソアミンに対して高感受性を示す細胞株の樹立に成功しただけでなく、DNA 修復酵素欠損株へ薬物代謝酵素を導入し、未修復の DNA の割合を増加させることにより高感受性を示す試験系を樹立することが可能であることを明らかにした。第 I,II 章でのヒト CYP2E1 の発現レベルは必ずしも高くはなく、さらに高感度にするためにはヒト CYP2E1 や OR を大量発現させる必要がある。そこで、ヒト CYP2E1 と OR を大量発現させ、且つ修復酵素欠損株を用いた試験系を開発することを第 III 章の目標とした。近年可能となった P450 の大腸菌での大量発現を変異原性試験に応用し、DNA 修復酵素を欠く変異原性試験菌株である WP2 uvrA-株にヒト CYP2E1 およびヒト OR の同時発現プラスミドを導入した。樹立した WP2-ER 株を用いて変異原性試験を行った結果、NDMA, NDEA, NDPA, NDBA, NPYR の変異原性を高感度に検出できた。また同時に NDPA, NDBA がヒト CYP2E1 によって代謝的に活性化され、その変異原性を示すことを初めて明らかにした。さらにラット肝 S9 mix を用いた試験系では検出が困難であった NPYR についてもその変異原性を高感度に検出できたことから、今回樹立した系が種差を克服し、ヒトでの変異原性を予測し得る試験系であることを明らかにした。

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 大 熊 康 修
副 査 助 教 授 有 吉 範 高

学 位 論 文 題 名

ヒト CYP2E1 遺伝子導入によるがん原・異変原物質 に高感受性な細胞株の樹立とその毒性学的应用

申請者はヒト肝臓に存在する重要な薬物代謝酵素の一つである CYP2E1 遺伝子を培養細胞や大腸菌に導入することにより、CYP2E1 によって代謝的に活性化される化学物質を高感度を検出する系の樹立を目的とし、世界的な研究成果を得た。すなわち、本研究ではヒトの酵素を細胞に発現させたため、この系を使えばヒトにおける化学物質のがん原性の予測が可能となる。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、およびヒトにおける毒性学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) チャイニーズハムスター由来の繊維芽細胞 CR-119 株への CYP2E1 の発現

先ず、変異原性試験に汎用されるチャイニーズハムスター線維芽細胞由来でモルモット NADPH-P450 還元酵素を安定的に発現する CR-119 株にヒト CYP2E1 cDNA を導入し、両酵素を同時に発現する ER-181 株を樹立した。コロニー形成率を指標とした細胞毒性試験を行ったところ、ER-181 株は親株である CR-119 株と比較してがん原性ニトロソアミンである N,N-dimethylnitrosamine (NDMA) に高感受性を示した。また、6-チオグアニン抵抗性を指標とした突然変異誘発試験を行ったところ、ER-181 株において NDMA による変異原性も観察された。以上、NADPH-P450 還元酵素を安定的に発現する細胞株にヒト CYP2E1 cDNA を導入することにより、従来その変異原性の検出が困難であったがん原性ニトロソアミンに対して高感受性な細胞株の樹立に成功した。また、がん原物質の代謝的活性化を担う薬物代謝酵素を培養細胞に安定的に

発現させることによって、それら化合物を高感度に検出できる試験系を開発することが可能であることを明らかにした。

(2) DNA 修復酵素欠損株へのヒト CYP2E1 遺伝子の導入とニトロソアミンへの感受性

がん原性ニトロソアミンに対して、より高感受性を示す試験系の開発を目指し、DNA 修復酵素のひとつである MGMT を欠損する細胞株へヒト CYP2E1 を導入した。DNA 修復酵素欠損株へヒト CYP2E1 cDNA を導入し、未修復の DNA の割合を増加させることにより高感受性を示す試験系の開発を目指した。アルキル化された DNA の修復を担っている MGMT を欠損する HeLa S3 Mer⁺株および MGMT を有する AC⁺1-6 株へヒト CYP2E1 を導入し、ほぼ同レベルのヒト CYP2E1 を安定的に発現する細胞 ME-17、AE-5 株を樹立した。これらの細胞株を用い、コロニー形成率を指標としてニトロソアミンの細胞毒性試験を行ったところ、ヒト CYP2E1 を導入した ME-17、AE-5 株においてがん原性ニトロソアミンである NDMA に対して感受性の上昇がみられ、特に DNA 修復酵素である MGMT を欠損する ME-17 株において著しく感受性が上昇していた。また 6-チオグアニン抵抗性を指標とした突然変異誘発試験を行ったところ ME-17 株においてのみ、NDMA による明らかな突然変異の誘発が認められた。

(3) CYP2E1 を大量に発現し、且つ修復酵素を欠損する遺伝子導入大腸菌の開発

これまでに開発した遺伝子導入培養細胞におけるヒト CYP2E1 の発現レベルは必ずしも高くはなく、さらに高感度な細胞を開発するためにはヒト CYP2E1 や NADPH-P450 還元酵素を大量に発現させる必要がある。そこで、ヒト CYP2E1 と NADPH-P450 還元酵素を大量に発現させ、且つ修復酵素欠損株を用いた試験系を開発することを目標とした。そのため、DNA 修復酵素を欠く WP2 uvrA⁻株にヒト CYP2E1 およびヒト NADPH-P450 還元酵素の同時発現プラスミドを導入した。樹立した WP2-ER 株を用いて変異原性試験を行った結果、NDMA などの変異原性を高感度に検出できた。また同時に今まで変異原性が検出されなかったいくつかのニトロソアミンがヒト CYP2E1 によって代謝的に活性化され、変異原性を示すことを初めて明らかにした。

以上、本研究はヒト CYP2E1 のヒトあるいは異種細胞への発現を例として、がん原性物質に対して高感受性を示す試験系の開発に成功し、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『ヒト CYP2E1 遺伝子導入によ

るがん原・変異原物質に高感受性な細胞株の樹立とその毒性学的応用』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。