

学 位 論 文 題 名

デブリスキン代謝多形の原因酵素・チトクローム
P4502D サブファミリーの酵素的特性に関する研究

－薬物代謝研究における P-450 ペプチド抗体の有用性－

学位論文内容の要旨

ヒト CYP2C19 及び CYP2D6 の遺伝的多型は医薬品の有効性及び安全性に大きな影響を及ぼす。特に、CYP2D6 は多くの塩基性医薬品の代謝に関与しており、薬効及び毒性の個体差が少ない医薬品を創製するためには、前臨床試験の段階で、CYP2D に依存する代謝反応を簡便に検出する方法が求められている。そこで、著者は、本研究において塩基性医薬品の代謝研究への CYP2D ペプチド抗体の応用を試みた。

1) まず、CYP2D により代謝をうける塩基性化合物の代表例として、プロプラノロール(PL)を取り上げ、ラット、イヌ、サル及びヒトにおける代謝の種差を比較した。その結果、PL の代謝に顕著な種差が存在することが明らかになった。特に 7 位水酸化活性は、ラットでは低基質濃度における主代謝経路であったのに対し、イヌではほとんど認められないことが明らかになった。ラット及びヒトの 7 位水酸化反応には CYP2D が関与していることが明らかになっている。これらの事実より、PL の 7 位水酸化反応に関しては、イヌの CYP2D は他の動物種の CYP2D とは異なる基質特異性を有することが判明した。

2) 前項でイヌ CYP2D は他の動物種と異なる基質特異性を有することが示唆された。そこで、イヌ CYP2D の酵素学的性質を明らかにするために、抗 P-450BTL 抗体(CYP2D2)との免疫交叉性を指標に、イヌ肝より P-450 を精製した(P-450CF1)。この P-450CF1 の N-末端のアミノ酸配列は、他の動物種の CYP2D サブファミリーに類似していた。また、イヌ CYP2D の cDNA の塩基配列より推測した N-末端のアミノ酸配列と比べると、N-末端から 4 残基を欠落させている以外は一致していた。CYP2D サブファミリーは BTL や PL などの β -遮断薬の代謝に関与していることが知られているが、P-450CF1 はこの BTL 4 位水酸化反応、PL の 4, 5 位水酸化反応及び N-脱イソプロピル化反応を触媒した。これらのことより、P-450CF1 はイヌの CYP2D サブファミリーであると結論した。また、P-450CF1 は PL の 7 位水酸化反応を有しておらず、前項の結果と矛盾しなかった。本研究では P-450CF1 の精製量が充分ではなく、P-450CF1 の抗体を作製することはできなかった。そこで、自己免疫疾患の患者の血清中に CYP2D6 に対する抗体が出現し

(LKM-1 抗体)、この抗体の抗原認識部位が DPAQPPRD であることに着目し、イヌの CYP2D のこの配列に対応する領域(DPAQPPRH)に対するペプチド抗体を作製した。その結果このペプチド抗体は P-450CF1 と免疫交叉性を示したのみならず、肝ミクロソームの BTL4 位水酸化反応を阻害し、P-450CF1 がイヌ CYP2D サブファミリーであることが立証できた。また、ペプチド抗体がそのものの抗体に替わる代替抗体として有用であることが示された。

3)前項の成果を発展させ、LKM1 抗体の CYP2D6 の認識部位に対応するラット、イヌ及びヒト CYP2D サブファミリーのペプチド抗体を作製した。ウェスタンブロットの結果から、ペプチド A(ラット及びヒト) に対する抗体はラット及びヒトの CYP2D を、また、ペプチド B (イヌ) に対する抗体は、イヌの CYP2D のみを認識していることが明らかになった。さらに、ペプチド B に対する抗体はイヌの肝ミクロソームの BTL4 位水酸化反応、PL4,5 位水酸化反応に対する阻害能を有していた。P-450 の精製操作は煩雑で、抗体を得ることは必ずしも容易ではない。本領域に対するペプチド抗体が、イヌのみならずヒトを含む他の動物種における薬物代謝研究に応用可能なことが示唆された。

以上、本研究においてイヌ肝チトクロームP-4502D 及び P-450 ペプチド抗体に対する基礎的知見を提供しえたものとする。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 田 正 一
副 査 教 授 中 里 幸 和
副 査 教 授 斉 藤 昌 之
副 査 助 教 授 升 田 真 木 彦

学 位 論 文 題 名

デブリソキン代謝多形の原因酵素・チトクローム P4502D サブファミリーの酵素的特性に関する研究

－薬物代謝研究における P-450ペプチド抗体の有用性－

ヒト薬物代謝酵素P-450の一分子種、CYP2Dは多くの医薬品の代謝に関与しており、この酵素の遺伝的多形が問題になっている。医薬品を創製するためには、動物からヒトへの外挿を考慮しなければならず、実験動物のCYP2Dの特性を明らかにしておく必要がある。中村氏はCYP2Dにより代謝を受けるプロプラノロール (P L) をモデル化合物として取り上げ、ラット、イヌ、サル及びヒトの肝臓における代謝に顕著な種差が存在することを明らかにした。特に7位水酸化活性は、ラットでは低基質濃度における主代謝経路であったのに対し、イヌではこの活性がほとんど認められないことが明らかになった。

そこで、イヌ肝よりCYP2Dサブファミリーに属するP-450を精製し (P-450CF1) その酵素学的特性を調べた。N-末端のアミノ酸配列は、他動物種のCYP2Dサブファミリーに類似していた。P-450CF1はブニトロロール (BTL) 4位水酸化反応、P Lの4, 5位水酸化反応及びN-脱イソプロピル化反応を触媒した。また、P-450CF1はP Lの7位水酸化反応能を有しておらず、前述の結果と矛盾しなかった。

本研究ではP-450CF1の精製量が充分ではなく、抗体を作製することはできなかった。そこで、ある種の肝炎に伴う自己免疫疾患の患者の血清中にCYP2Dに対する抗体 (L K M-1 抗体) が出現することに着目し、ヒトCYP2D認識部位に対応するイヌCYP2Dの領域 (D P A Q P P R H) に対するペプチド抗体を作製した。このペプチド抗体はP-450CF1と免疫交叉性を示し、肝ミクロソームのB T L 4位水酸化反応を阻害した。

この成果を発展させ、ラット、イヌ及びヒトCYP2Dサブファミリーのペプチド抗体を作製した。ウェスタンブロットの結果から、これらの抗体は極めて特異性が高いことが

明かになった。P-450の精製操作は煩雑で、抗体を得ることは必ずしも容易ではない。本領域に対するペプチド抗体が、イヌのみならずヒトを含む他の動物種における薬物代謝研究に応用可能なことが示された。

以上のように、中村氏はイヌのCYP2Dを精製してその特性を明らかにし、これと反応するP-450ペプチド抗体を、ヒトの自己免疫疾患から着想して作製することに成功し、これに対する基礎的知見を提供した。今後、類似の手法で得たペプチド抗体が微量P-450依存の薬物代謝研究に極めて有用となると考えられる。よって、審査員一同は中村明生氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判断した。