

学位論文題名

スunksにおける薬物代謝酵素に関する研究

学位論文内容の要旨

1. はじめに

医薬品の開発過程におけるヒト臓器などを用いた研究は、ヒトの代謝物の生成を定性的に予測するには適した方法であるが、その結果から *in vivo* における薬物動態や毒性を定量的に予測することは困難であり、薬物動態や安全性試験には実験動物の使用が依然として必須となっている。ところが、薬物代謝酵素などの生化学的特性は種によって異なっているため、実験動物からヒトへの外挿を行う場合、数多くの実験動物でのデータが必要であり、幅広い動物種を用いることが重要である。そこで、著者は、食虫目、トガリネズミ科、ジャコウネズミ属に分類され、系統発生的に齧歯類と霊長類の間に位置すると考えられているスunks (*Suncus murinus*) に着目した。スunksは嘔吐反応を示す唯一の小型動物であり、鎮吐薬のスクリーニングにおける有用性が報告されている。本研究ではスunksの実験動物としての有用性評価の一環として、主要組織における薬物代謝酵素の発現量及び活性を調べることを目的とした。

2. スunksの主要組織における種々の薬物代謝酵素の発現

既にスunksは *N*-アセチル転移酵素 (NAT) を欠損することが明らかにされている。本研究では NAT 以外の薬物代謝酵素がスunksで発現しているか否かを調べる目的で、7 週齢のスunksの主要組織より総 RNA を調製し、8 種類のチトクローム P450 (CYP)、5 種類のフラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO)、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 1*6、アリル硫酸転移酵素、グルタチオン *S*-転移酵素 (GST) 1、カルボキシエステラーゼおよびエポキシドヒドロラーゼの cDNA をプローブとしてノーザンブロット分析を行った。その結果、スunksでは CYP3A および FMO1~5 の mRNA 発現レベルが極めて低いことが判明した。さらに、スunks肺において CYP2A の高発現が見られた。

3. スunksにおける CYP の発現量および酵素活性

CYP3A 誘導薬デキサメタゾン投与したスunks肝では CYP3A の mRNA のシグナルが検出されたことより、スunksでは CYP3A 遺伝子自身は存在することが示されたが、常在的な CYP3A の発現量は低いことが確認された。また、スunks肝ミクロゾームにおいて、CYP3A に特異的なミダゾラム水酸化酵素活性がラットの 1/6 であることが判明した。これらの結果より、スunksは CYP3A が関与する代謝反応の poor metabolizer (PM) 型の表現型を示すことが示唆された。

スunks肺の CYP2A の発現量はラット、マウスの 100 倍以上であった。そこで、スunksおよびラットの肺ミクロゾームを用いて、CYP2A に特異的な SM-12502 *S*-酸化酵素活性の速度論的解析を行ったところ、スunksにおける V_{max}/K_m はラットに比べて 99 倍大きい値であった。

さらに、NNK を被験物質として用いた Ames 試験において、スunks肺 S-9 を酵素源として用いた場合、NNK 濃度依存的に復帰変異コロニー数の増加が認められた。一方、ラット肺 S-9 では、NNK 濃度が増加してもコロニー数は増大しなかった。すなわち、肺 CYP2A が代謝的活性化に関与する変異原物質に対して、スunksは高感受性であることが示唆された。

4. スンクスにおけるトリメチルアミン N-酸化酵素の低発現：魚臭症候群の実験モデルとして

魚臭症候群は FMO の遺伝的欠損が原因となる疾患である。この疾患の患者はトリメチルアミン (TMA) を N-酸化体 (TMAO) に代謝することができないため、尿、汗、唾液、呼気中に大量の TMA を排泄する結果、魚のようなアミン臭を発することが知られている。

肝ミクロソームによる TMA N-酸化酵素活性において、スンクスの low-Km 酵素のパラメーターをラットと比較したところ、スンクスの Km 値は 2 倍高く、Vmax 値は 1/4 であった。スンクス肝ミクロソームによる TMA N-酸化酵素活性は FMO 阻害薬メチマゾール、チオウレア、チオベンズアミドによって活性が 96~100%減少したが、CYP 阻害薬の影響は見られなかった。すなわち、スンクスにおける TMA N-酸化反応に関与する酵素は CYP ではなく、FMO であることが示された。スンクスとラットにおける TMA N-酸化酵素活性の差はスンクスの Vmax が低いこと、すなわち、FMO 酵素量が少ないことが原因と考えられた。

TMA を 10 mg/kg の用量で腹腔内投与したとき、投与後 24 時間までのスンクスの尿中 TMA/TMAO 比は 1.42 であり、この値は健常人 (0.05~0.11) およびラット (0.11) より 13 倍高かった。すなわち、スンクスは TMA N-酸化酵素活性において PM 型の表現型を示し、魚臭症候群の実験モデルとなることが示された。

5. パーキンソン病様症状誘発物質 MPP⁺のスンクス脳内への蓄積

パーキンソン病様症状誘発物質である 1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジジ (MPTP) は血液-脳関門 (BBB) を通過後、脳内のモノアミンオキシダーゼ B (MAO-B) により代謝中間体である MPDP⁺を経由して MPP⁺へと活性化されたのち神経細胞死を引き起こす。MPTP の解毒経路としては、FMO による N-酸化、CYP による N-脱メチル化が知られている。そこで、MPTP の作用部位である脳での MPTP 代謝について、スンクスとラットを比較し、MPTP の解毒に対する脳内 FMO の寄与を調べた。

スンクスとラットの脳ホモジネートによる MPP⁺生成活性は同程度であった。また、ラット脳ホモジネートによる MPTP N-酸化酵素活性の Vmax 値は MPP⁺生成活性の約 1/100 であったが、Km 値は約 2 μM と高い親和性を示した。一方、スンクスでは MPTP N-酸化酵素活性は定量限界以下であった。また、ラット脳毛細血管ホモジネートの MPTP N-酸化酵素活性は脳ホモジネートの 11 倍以上であったことより、FMO は脳毛細血管内皮細胞、すなわち、BBB に局在することが示唆された。

さらに、MPTP を腹腔内投与した場合、スンクスはラットに比べて高い脳内 MPP⁺濃度を示し、Cmax および T_{1/2} はそれぞれ 2 倍および 13 倍であった。すなわち、BBB における FMO 活性が低いスンクスでは N-酸化が行なわれにくく、その結果 MPP⁺が脳内に蓄積するものと考えられた。

まとめ

- 1) スンクスでは CYP3A および FMO1~5 の mRNA の発現量が低レベルであった。また、スンクス肺において CYP2A の高発現が見られた。
- 2) スンクス肺 S-9 を酵素源として Ames 試験を行ったところ、NNK 濃度依存的に復帰変異コロニー数の増加が認められた。
- 3) FMO の代表的な基質の TMA の N-酸化酵素活性において、スンクスは PM 型のフェノタイプを示した。
- 4) MPTP をスンクスに投与したところ、毒性本体である MPP⁺の著しい脳内蓄積が見られた。

これらの知見から、スンクスは肺 CYP2A で活性化されるニトロソアミン類の発がん性について、あるいは魚臭症候群のモデル動物に代表される、FMO 活性における PM 型の表現型の *in vivo* 実験モデルとなることが示された。

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 教授 井 関 健
副査 助教授 有 吉 範 高

学位論文題名

スunksにおける薬物代謝酵素に関する研究

申請者は、スunksの実験動物としての有用性評価の一環として、主要組織における薬物代謝酵素の発現量及び活性を調べることを目的とし、世界的な研究成果を得た。すなわち、本研究では、スunksは肺チトクローム P450 2A (CYP2A) で活性化されるニトロソアミン類の発がん性について、あるいは魚臭症候群のモデル動物に代表される、フラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO) 活性における poor metabolizer (PM) 型の表現型を示す *in vivo* 実験モデルとなることが示された。本研究は、スunksを用いた薬物動態試験や安全性試験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。

1. スunksの主要組織における種々の薬物代謝酵素の発現

既にスunksはN-アセチル転移酵素 (NAT) を欠損することが明らかにされている。本研究では NAT 以外の薬物代謝酵素がスunksで発現しているか否かを調べる目的で、7週齢のスunksの主要組織より総 RNA を調製し、8種類の CYP, 5種類の FMO, UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 1*6, アリル硫酸転移酵素, グルタチオン S-転移酵素 (GST) 1, カルボキシエステラーゼおよびエポキシドヒドラーゼの cDNA をプローブとしてノーザンブロット分析を行った。その結果、スunksでは CYP3A および FMO1~5 の mRNA 発現レベルが極めて低いことが判明した。さらに、スunks肺において CYP2A の高発現が見られた。

2. スunksにおける CYP の発現量および酵素活性

CYP3A 誘導薬デキサメタゾン投与したスunks肝では CYP3A の mRNA のシグナルが検出されたことより、スunksでは CYP3A 遺伝子自身は存在することが示されたが、常在的な CYP3A の発現量は低いことが確認された。また、スunks肝マイクロゾームにおいて、CYP3A に特異的なミダゾラム水酸化酵素活性がラットの 1/6 であることが判明した。これらの結果より、スunksは CYP3A が関与する代謝反応の PM 型の表現型を示すことが示唆された。

スunks肺の CYP2A の発現量はラット、マウスの 100 倍以上であった。そこで、スunksおよびラットの肺マイクロゾームを用いて、CYP2A に特異的な SM-12502 S-酸化酵素活性の速度論的解析を行ったところ、スunksにおける V_{max}/K_m はラットに比べて 99 倍大きい値であった。さらに、NNK を被験物質として用いた Ames 試験において、スunks肺 S-9 を酵素源として用いた場合、NNK 濃度依存的に復帰変異コロニー数の増加が認められた。一方、ラット肺 S-9 では、NNK 濃度が増加してもコロニー数は増大しなかった。すなわち、肺 CYP2A が代謝的活性化に関与する変異原物質に対して、スunksは高感受性であることが示唆された。

3. スンクスにおけるトリメチルアミン *N*-酸化酵素の低発現：魚臭症候群の実験モデルとして
魚臭症候群は FMO の遺伝的欠損が原因となる疾患である。この疾患の患者はトリメチルアミン (TMA) を *N*-酸化体 (TMAO) に代謝することができないため、尿、汗、唾液、呼気中に大量の TMA を排泄する結果、魚のようなアミン臭を発することが知られている。

肝マイクロゾームによる TMA *N*-酸化酵素活性において、スンクスの low-*K_m* 酵素のパラメーターをラットと比較したところ、スンクスの *K_m* 値は 2 倍高く、*V_{max}* 値は 1/4 であった。スンクス肝マイクロゾームによる TMA *N*-酸化酵素活性は FMO 阻害薬メチマゾール、チオウレア、チオベンズアミドによって活性が 96~100% 減少したが、CYP 阻害薬の影響は見られなかった。すなわち、スンクスにおける TMA *N*-酸化反応に関与する酵素は CYP ではなく、FMO であることが示された。スンクスとラットにおける TMA *N*-酸化酵素活性の差はスンクスの *V_{max}* が低いこと、すなわち、FMO 酵素量が少ないことが原因と考えられた。

TMA を 10 mg/kg の用量で腹腔内投与したとき、投与後 24 時間までのスンクスの尿中 TMA/TMAO 比は 1.42 であり、この値は健常人 (0.05~0.11) およびラット (0.11) より 13 倍高かった。すなわち、スンクスは TMA *N*-酸化酵素活性において PM 型の表現型を示し、魚臭症候群の実験モデルとなることが示された。

4. パーキンソン病様症状誘発物質 MPP⁺のスンクス脳内への蓄積

パーキンソン病様症状誘発物質である 1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6-テトラヒドロピリジン (MPTP) は血液-脳関門 (BBB) を通過後、脳内のモノアミンオキシダーゼ B (MAO-B) により代謝中間体である MPDP⁺を経由して MPP⁺へと活性化されたのち神経細胞死を引き起こす。MPTP の解毒経路としては、FMO による *N*-酸化、CYP による *N*-脱メチル化が知られている。そこで、MPTP の作用部位である脳での MPTP 代謝について、スンクスとラットを比較し、MPTP の解毒に対する脳内 FMO の寄与を調べた。

スンクスとラットの脳ホモジネートによる MPP⁺生成活性は同程度であった。また、ラット脳ホモジネートによる MPTP *N*-酸化酵素活性の *V_{max}* 値は MPP⁺生成活性の約 1/100 であったが、*K_m* 値は約 2 μM と高い親和性を示した。一方、スンクスでは MPTP *N*-酸化酵素活性は定量限界以下であった。また、ラット脳毛細血管ホモジネートの MPTP *N*-酸化酵素活性は脳ホモジネートの 11 倍以上であったことより、FMO は脳毛細血管内皮細胞、すなわち、BBB に局在することが示唆された。

さらに、MPTP を腹腔内投与した場合、スンクスはラットに比べて高い脳内 MPP⁺濃度を示し、*C_{max}* および *T_{1/2}* はそれぞれ 2 倍および 13 倍であった。すなわち、BBB における FMO 活性が低いスンクスでは *N*-酸化が行なわれにくく、その結果 MPP⁺が脳内に蓄積するものと考えられた。

以上、本研究では、スンクスは肺 CYP2A で活性化されるニトロソアミン類の発がん性について高感受性を示すことが示唆された。さらに、スンクスは魚臭症候群のモデル動物に代表される、FMO 活性における PM 型の表現型を示す *in vivo* 実験モデルとなることが示され、世界的にもユニークな研究を展開した。本論文「スンクスにおける薬物代謝酵素に関する研究」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られた。