

学 位 論 文 題 名

ヒト CYP と NADPH-CYP 還元酵素を同時に発現する 細菌の薬物代謝・毒性学的研究への応用

学位論文内容の要旨

1. はじめに

CYP は外来異物の解毒的な代謝のみならず、環境中の変異原物質の代謝的な活性化にも関与する。がん原性 *N*-ニトロソアミンは CYP により活性化されて毒性を示す。各 CYP 分子種の発現量や基質特異性には種差が存在するため、ヒトにおける変異原性を予測するためには、実験動物によらずに直接的にヒトにおける変異原性を予測する方法が必要である。従来、*N*-ニトロソアミンのヒト CYP による活性化は、mM オーダーの基質を用いて検討されてきた。*N*-ニトロソアミンの生体内における濃度は $1\ \mu\text{M}$ 以下であると考えられるため、変異原活性化は μM レベルの基質を用いて検討する必要があると考えられる。以上の問題点を克服するために、Ames 試験に用いられるサルモネラ菌の菌体内にヒト CYP と NADPH-CYP 還元酵素 (OR) を発現し、変異原性試験を行うことを考案した。菌体内にて生成した活性代謝物は容易に細菌の遺伝子と結合するため、変異原活性化が高感度に検出できると期待された。

そこで本研究では、ヒト CYP と OR を同時に発現するサルモネラ菌 YG7108 株を樹立した。続いて、樹立したサルモネラ菌株を用い、がん原性 *N*-ニトロソアミンの変異原活性化におけるヒト CYP の役割を検討した。さらに、当研究室にて樹立したヒト CYP と OR を同時に発現する大腸菌を用いて *in vitro* 阻害実験を行い、*N*-ニトロソアミンの活性化に関与するヒト CYP に関して、その酵素活性を阻害する物質を探索し（発がんの化学予防に向けた研究）、また抗がん薬のヒト CYP による代謝を介した薬物間相互作用を検討した（適正ながんの化学療法の実現に向けた研究）。ヒト CYP により生成した代謝物や活性代謝物の一部は、第 II 相反応を触媒する酵素により抱合され解毒される。したがって、CYP の機能に加えて第 II 相反応を触媒する酵素の役割を検討することは、変異原・がん原物質や抗がん薬の毒性、薬効を総合的に検討するために重要である。そこで第 II 相反応を触媒する酵素の一例として、ヒトグルクロン酸転移酵素 (UGT) を発現するサルモネラ菌株を樹立した。

2. ヒト CYP と OR を同時に発現するサルモネラ菌の樹立

11 種類のヒト CYP のそれぞれと OR を同時に発現するサルモネラ菌 YG7108 株を樹立した。CYP の発現量は、分子種により異なっていた。例えば、培地 1 L あたりの CYP2A6 の発現量は、ヒトの肝臓約 300 g 分に相当した。OR も CYP が触媒活性を示すのに十分量発現していた。サルモネラ菌に発現したそれぞれの CYP は、典型的な基質に対して酵素活性を示した。酵素反応のキネティックパラメータは、ヒト肝ミクロゾームや他のヒト CYP 発現系を用いて得られた結果と概ね一致した。

3. がん原性 *N*-ニトロソアミン類の変異原活性化におけるヒト CYP の役割

樹立したサルモネラ菌株を用い、がん原性 *N*-ニトロソアミンの変異原活性化におけるヒト CYP の役割を検討した。樹立したサルモネラ菌を用い、*N*-ニトロソアミンの活性化を μM のレベルにて検出することに成功した。さらに、以下の新規な知見を得た。すなわち、CYP2A6 が NDMA を除く検討した全てのたばこ煙、食品および化粧品などに含まれる *N*-ニトロソアミンの活性化に関与することを見いだした。また、*N*-アルキルニトロソアミンのアルキル側鎖の長さが、活性化に関与する CYP 分子種の決定因子の一つであることも見いだした。

4. 大腸菌に発現したヒト CYP を用いた阻害物質の探索

CYP2A6 の酵素活性を阻害することができれば、変異原活性化の抑制、ひいては発がんの化学予防につながると期待される。そこで、大腸菌の菌体膜に発現したヒト CYP2A6 を用いて *in vitro* 阻害実験を行い、CYP2A6 の阻害物質を網羅的に探索した。22 種類の有機含硫化合物および 21 種類のフラボノイド類について検討した。合成の有機含硫化合物である 4,4'-ジピリジルジスルフィドおよび 4,4'-ジピリジルスルフィドが CYP2A6 の酵素活性を阻害した (K_i 値 数 10 nM)。タマネギに含まれるジ-*n*-プロピルジスルフィドやニンニクに含まれるジアリルジスルフィドも CYP2A6 の酵素活性を阻害した。 K_i 値は μM のオーダーであった。またフラボノイドであるフィセチンも、CYP2A6 の酵素活性を阻害した (K_i 値 約 1 μM)。

5. 抗がん薬パクリタキセルのヒト CYP による代謝におよぼす併用薬の影響の予測

臨床の現場では、抗がん薬による化学療法が行われている。抗がん薬を適用する患者には他の薬物を様々な組み合わせで併用する可能性がある。抗がん薬と他の薬物の併用に起因する薬物間相互作用を未然に予測することは重要である。そこで、抗がん薬パクリタキセルを他の薬物と併用した場合に、CYP を介した薬物間相互作用が生じる可能性があるか否かを、大腸菌に発現したヒト CYP2C8 を用いて検討した。ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬と抗がん薬のタモキシフェンが、CYP2C8 によるパクリタキセル 6 α -水酸化反応を競合的に阻害した。ニカルジピンの阻害効果が最大であった (K_i 値 55 nM)。

6. ヒト UGT1A1 を発現するサルモネラ菌の樹立

ヒト UGT1A1 を発現するサルモネラ菌 TA1535 株を樹立した。サッカリン酸 1,4-ラクトンなどを反応系に添加し、サルモネラ菌 TA1535 株の β -グルクロニダーゼを阻害することにより、発現したヒト UGT1A1 のビリルビンに対するグルクロン酸抱合酵素活性を検出することに成功した。樹立したサルモネラ菌株は今後、ヒト CYP と OR を同時に発現するサルモネラ菌株や大腸菌株と併用して、CYP により生成した化学物質の、UGT1A1 による解毒的な代謝の検討に応用することが可能であると考えられる。

7. まとめ

本研究では、以下の結論を得た。

- (1) 11 種類のヒト CYP のそれぞれと OR を同時に発現するサルモネラ菌 YG7108 株の樹立に成功した。
- (2) 樹立したサルモネラ菌株を用い、がん原性 *N*-ニトロソアミンの変異原活性化を、 μM のオーダーで検出することに成功した。また、*N*-ニトロソアミンの活性化に主として CYP2A6 が関与することを見いだした。
- (3) 大腸菌に発現したヒト CYP を用いて、CYP2A6 の阻害物質を網羅的に探索し、4,4'-ジピリジルジスルフィド、4,4'-ジピリジルスルフィド、ジ-*n*-プロピルジスルフィドおよびジアリルジスルフィドが CYP2A6 を阻害することを見いだした。またフィセチンが、CYP2A6 の酵素活性を阻害することも明らかにした。

- (4) 大腸菌に発現したヒト CYP2C8 を用いて *in vitro* 阻害実験を行い、降圧薬ニカルジピンが抗がん薬パクリタキセルの代謝を阻害することを見いだした。
- (5) ヒト UGT1A1 を発現するサルモネラ菌 TA1535 株を樹立した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鎌 滝 哲 也

副 査 教 授 井 関 健

副 査 教 授 原 島 秀 吉

副 査 助教授 山 崎 浩 史

学 位 論 文 題 名

ヒト CYP と NADPH-CYP 還元酵素を同時に発現する 細菌の薬物代謝・毒性学的研究への応用

CYP は外来異物の解毒的な代謝のみならず、環境中の変異原物質の代謝的な活性化にも関与する。各 CYP 分子種の特性には種差が存在するため、ヒトにおける変異原性の予測は、実験動物によらずに直接的に実施する必要がある。本研究ではヒト CYP による変異原物質の活性化を高感度に検出するために、Ames 試験に用いられるサルモネラ菌 YG7108 株の菌体内にヒト CYP と NADPH-CYP 還元酵素 (OR) を発現して変異原性試験を行うことを考案し、新規菌株を樹立した。続いて、樹立したサルモネラ菌株およびヒト CYP と OR を同時に発現する大腸菌株を薬物代謝および毒性学的研究に応用した。本研究ではまず、がん原性 *N*-ニトロソアミンの変異原活性化におけるヒト CYP の役割について新規な知見を提供した。続いて活性化に関与するヒト CYP2A6 の活性を阻害する新規な物質を見いだした (発がんの化学予防に向けた研究)。さらに抗がん薬パクリタキセルのヒト CYP を介した薬物間相互作用に関する新規な知見を提供した (適正ながんの化学療法の実現に向けた研究)。また CYP の機能に加えて第 II 相反応を触媒する酵素の役割をも総合的に検討するために、ヒトグルクロン酸転移酵素 (UGT) を発現するサルモネラ菌株も樹立した。本研究の成果は以下に詳述するように極めて優れたものであると評価される。

(I) ヒト CYP と OR を同時に発現するサルモネラ菌の樹立

11 種類のヒト CYP のそれぞれと OR を同時に発現するサルモネラ菌 YG7108 株を樹立した。CYP の発現量は、分子種により異なっていた。例えば、培地 1 L あたりの CYP2A6 の発現量は、ヒトの肝臓約 300 g 分に相当した。OR も CYP が触媒活性を示すのに十分量発現していた。発現したそれぞれの CYP は、典型的な基質に対して十分な酵素活性を示した。

(2) がん原性 *N*-ニトロソアミン類の変異原活性化におけるヒト CYP の役割

樹立したサルモネラ菌株を用い、ヒト CYP によるがん原性 *N*-ニトロソアミンの変異原活性化を検討した。*N*-ニトロソアミンの活性化を μM のレベルにて検出することに成功した。さらに、CYP2A6 が NDMA を除く検討した全てのがん原性 *N*-ニトロソアミンの活性化に関与することを見いだした。また、*N*-アルキルニトロソアミンのアルキル側鎖の長さが、活性化に関与する CYP 分子種の決定因子の一つであることも見いだした。

(3) 大腸菌に発現したヒト CYP を用いた阻害物質の探索

CYP2A6 の酵素活性を阻害することができれば、変異原活性化の抑制、ひいては発がんの化学予防につながると期待される。そこで、大腸菌の菌体膜に発現したヒト CYP2A6 を用いて CYP2A6 の阻害物質を網羅的に探索した。合成の有機含硫化合物である 4,4'-ジピリジルジスルフィドおよび 4,4'-ジピリジルスルフィドが CYP2A6 の酵素活性を阻害した (K_i 値 数 10 nM)。タマネギに含まれるジ-*n*-プロピルジスルフィドやニンニクに含まれるジアリルジスルフィドも CYP2A6 の酵素活性を阻害した。 K_i 値は μM のオーダーであった。またフラボノイドであるフィセチンも、CYP2A6 の酵素活性を阻害した (K_i 値 約 1 μM)。

(4) 抗がん薬パクリタキセルのヒト CYP による代謝におよぼす併用薬の影響の予測

臨床の現場において抗がん薬を適用する患者には、他の薬物を様々な組み合わせで併用する可能性がある。抗がん薬と他の薬物の併用に起因する薬物間相互作用を未然に予測することは重要である。そこで、抗がん薬パクリタキセルを他の薬物と併用した場合に、CYP を介した薬物間相互作用が生じる可能性があるか否かを、大腸菌に発現したヒト CYP2C8 を用いて検討した。ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬と抗がん薬のタモキシフェンが、CYP2C8 によるパクリタキセル 6 α -水酸化反応を競合的に阻害した。ニカルジピンの阻害効果が最大であった (K_i 値 55 nM)。

(5) ヒト UGT1A1 を発現するサルモネラ菌の樹立

ヒト UGT1A1 を発現するサルモネラ菌 TA1535 株を樹立した。サルモネラ菌 TA1535 株の β -グルクロニダーゼを阻害することにより、発現したヒト UGT1A1 のビリルビンに対するグルクロン酸抱合酵素活性を検出することに成功した。

以上、ヒト CYP と OR を同時に発現するサルモネラ菌株を新規に樹立し、ヒト CYP と OR を同時に発現する大腸菌株と共に薬物代謝および毒性学的研究に応用して多数の新規な知見を得ることに成功した。本論文『ヒト CYP と NADPH-CYP 還元酵素を同時に発現する細菌の薬物代謝・毒性学的研究への応用』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。