

学位論文題名

河川水から単離された変異原物質 2

ーフェニルベンゾトリアゾール (PBTA) 類のヒトにおける  
発がんリスクの予測：ヒト CYP1A1 の役割を中心として

学位論文内容の要旨

1. 序論

ヒトにおける発がんの原因の多くは環境中の化学物質への曝露であるといわれている。化学物質による発がん(化学発がん)はいくつかの段階に分けて考えられている。その初期段階(イニシエーション)においては化学物質により遺伝子の突然変異が誘発される。遺伝子変異を誘発する化学物質(変異原物質)の多くは生体内で代謝的に活性化され、生じた活性代謝物が遺伝子と付加体を形成して遺伝子変異を誘発する。

変異原物質の代謝的活性化にはチトクローム P450 (CYP) が主に関与することが知られている。CYPには性質や発現臓器分布の異なる多くの分子種が存在する。また、CYPの性質には種差が存在しており、同一のファミリーに属する分子種でも種間で性質が異なる場合がある。CYPの性質や発現臓器分布はヒトにおいて変異原物質が代謝的に活性化されるか否か、また活性化される場合、どの組織で活性化されるかを決定する因子のひとつであると考えられるので、変異原物質の代謝的活性化に関与するヒト CYP 分子種を同定することは変異原物質がヒトにおいて遺伝子変異を誘発するか否かを予測するために重要である。

2-フェニルベンゾトリアゾール (PBTA) 類は国内の河川水より新規に単離された変異原物質である。これらの化学物質はラット肝 9,000 × g 上清画分に含まれる酵素により代謝的に活性化され、サルモネラ菌 TA98 株を用いた Ames 試験にて遺伝子変異を誘発した。PBTA 類が単離された河川には都市部や住宅地を流れるものもあり、流域周辺の住民がこれらの化学物質に曝露している可能性が考えられる。しかしながら、これらの化学物質がヒトの体内で活性化されて遺伝子変異を誘発するか否か、また、これらの化学物質がヒトにおいて発がんリスクとなりうるか否かは不明であった。そこで、PBTA 類のヒトにおける発がんリスクを予測するため、これらの化学物質が CYP などのヒトの薬物代謝酵素により活性化されるか否かを解明することを目的とした。

2. ヒト CYP および NADPH-CYP 還元酵素を同時に発現するサルモネラ菌 TA1538 株の樹立

まず、PBTA 類のヒト CYP による代謝的活性化を検討し、活性化に関与する CYP 分子種を同定するために、Ames 試験に用いられるサルモネラ菌にヒト CYP を発現させ、それを用いて変異原性試験を行った。PBTA 類に感受性を示した TA98 株の親株であるサルモネラ菌 TA1538 株を宿主として選択した。11 種類のヒト CYP (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 および CYP3A5) のそれぞれと CYP が触媒活性を示すのに必要な電子を供給する酵素である NADPH-CYP 還元酵素 (OR) をサルモネラ菌 TA1538 株に同時に発現させることに成功した。サルモネラ菌 TA1538 株に発現したヒト CYP はそれぞれの分子種の代表的な基質に対して触媒活性を示し

た。さらに、樹立した菌株を用いて代表的な変異原物質 (ベンゾ[a]ピレン, アフラトキシン B<sub>1</sub>, 2-アミノ-1-メチル-4-フェニルイミダゾ[4,5-b]ピリジンおよび 2-アセチルアミノフルオレン) のヒト CYP による活性化を検出した。活性化に関与した CYP 分子種は過去の知見と概ね一致した。以上、変異原物質のヒト CYP による代謝的活性化を検出し、関与する CYP 分子種を容易に同定できる変異原性試験系の樹立に成功した。

### 3. ヒト CYP1A1 および *N*-アセチル転移酵素 2 による PBTA 類の代謝的活性化

樹立したヒト CYP を発現するサルモネラ菌 TA1538 株を用いて、ヒト CYP による PBTA 類の活性化を検討した。ベンゼン環の 4 位の置換基がそれぞれ異なる 6 種類の PBTA 類 (PBTA-1 [-N(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], PBTA-2 [-N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)CN], PBTA-3 [-NH(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH)], PBTA-4 [-NH<sub>2</sub>], PBTA-5 [-N(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OCOCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] および PBTA-6 [-N(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH)<sub>2</sub>]) について検討した。検討した 6 種類の PBTA 類は全てサルモネラ菌に発現したヒト CYP1A1 によりほぼ特異的に活性化されて遺伝子変異を誘発した。

PBTA 類はベンゾトリアゾール環に一級アミノ基が結合している構造的特徴からヘテロサイクリックアミン (HCA) 類の一種であると考えられる。HCA 類は、ヒトにおいては CYP, 殊に CYP1A2 による *N*-水酸化, およびそれに引き続く *N*-アセチル転位酵素 2 (NAT2) による *O*-アセチル化により活性化されると考えられている。著者は PBTA 類の活性化にもまたヒト NAT2 が関与するか否かを検討し、これらの化学物質がヒト CYP1A1 による活性化に引き続き NAT2 によりアセチル化を介して活性化されることを明らかにした。以上、PBTA 類はヒトの薬物代謝酵素により活性化されて遺伝子変異を誘発することを明らかにした。

### 4. PBTA 類による CYP1A1 の発現の誘導

PBTA 類の活性化にほぼ特異的に関与した CYP1A1 は構成的には肝にほとんど発現しないが、多環芳香族炭化水素 (PAH) 類などにより発現が誘導されることが知られている。著者は、PBTA 類が CYP1A1 の発現を誘導する場合、PBTA 類は誘導された CYP1A1 により代謝的に活性化される可能性があると考えた。そこで、PAH 類により CYP1A1 の発現が誘導されることが知られているヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用い、PBTA 類が CYP1A1 の発現を誘導するか否かを検討した。検討した 3 種類の PBTA 類 (PBTA-1, PBTA-2 および PBTA-6) は全て HepG2 細胞において CYP1A1 遺伝子の転写を活性化し、CYP1A1 mRNA の発現を誘導した (1 μM のときに溶媒対照の約 1.9-5.6 倍)。PBTA 類による CYP1A1 の誘導機構は現在まで知られている CYP1A1 の誘導と同様の機構であった。さらに、PBTA-6 を混餌投与 (400-600 ppm) されたラットの肝において CYP1A1 mRNA の発現量が対照の約 2.4-3.5 倍に上昇することを見出し、*in vivo* において PBTA 類が肝の CYP1A1 を誘導することを証明した。

### 5. まとめ

本研究を通して以下の新規な知見を得た。

- 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 TA1538 株を樹立した。
- 樹立した試験菌株を用いた変異原性試験により、PBTA 類がヒト CYP1A1 により活性化されることを明らかにした。PBTA 類は CYP1A1 による活性化の後にヒト NAT2 によるアセチル化を介してさらに活性化され、遺伝子変異を誘発することを見出した。
- PBTA 類はヒト肝がん由来 HepG2 細胞において CYP1A1 mRNA の発現を誘導した。さらに、ラット肝においても PBTA-6 により CYP1A1 mRNA の発現が誘導されることを明らかにした。

以上の結果より、河川水より単離された変異原物質である PBTA 類がヒトにおいて CYP1A1 を誘導し、誘導された CYP1A1 により代謝的に活性化されて遺伝子変異を誘発し、がんを引き起こす可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	鎌	滝	哲	也
副査	教授	原	島	秀	吉
副査	助教授	紙	谷	浩	之
副査	助教授	山	崎	浩	史

学位論文題名

## 河川水から単離された変異原物質 2

### 2-フェニルベンゾトリアゾール (PBTA) 類のヒトにおける 発がんリスクの予測：ヒト CYP1A1 の役割を中心として

ヒトにおける発がんの多くは環境中の化学物質による遺伝子変異によると言われている。遺伝子変異を誘発する化学物質 (変異原物質) の多くは生体内で代謝的に活性化されて遺伝子変異を誘発すると考えられている。ヒトにおける変異原物質の代謝的活性化にはチトクローム P450 (CYP) が主に関与することが知られている。

2-フェニルベンゾトリアゾール (PBTA) 類は河川水より新規に単離された変異原物質である。これらの化学物質はラット肝 9,000 × g 上清画分に含まれる酵素により活性化され、サルモネラ菌 TA98 株を用いた Ames 試験にて遺伝子変異を誘発した。しかし PBTA 類がヒトの体内で活性化されて遺伝子変異を誘発するか否か、またこれらの化学物質がヒトにおいてがんを誘発するか否かは不明であった。そこで、PBTA 類のヒトにおける発がんリスクを予測するため、これらの化学物質が CYP などのヒトの薬物代謝酵素により活性化されるか否かを解明することを目的とした。以下に詳述するように、本研究の成果は極めて優れたものであると評価される。

#### 1. ヒト CYP および NADPH-CYP 還元酵素を同時に発現するサルモネラ菌 TA1538 株の樹立

先ず、PBTA 類のヒト CYP による代謝的活性化を検討し、活性化に関与する CYP 分子種を同定するための試験系として、PBTA 類に感受性を示したサルモネラ菌 TA98 株の親株である TA1538 株にヒト CYP を発現させた。11 種類のヒト CYP (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 および CYP3A5) のそれぞれと CYP が触媒活性を示すのに必要な電子を供給する酵素である NADPH-CYP 還元酵

素をサルモネラ菌 TA1538 株と同時に発現させることに成功した。樹立した菌株を用いて代表的な変異原物質のヒト CYP による活性化を検出した。活性化に関与した CYP 分子種は過去の知見と概ね一致した。

## 2. ヒト CYP1A1 および *N*-アセチル転移酵素 2 による PBTA 類の代謝的活性化

樹立したサルモネラ菌 TA1538 株を用いてヒト CYP による PBTA 類の活性化を検討した。ベンゼン環の 4 位の置換基がそれぞれ異なる 6 種類の PBTA 類 (PBTA-1 [-N(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], PBTA-2 [-N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)CN], PBTA-3 [-NH(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH)], PBTA-4 [-NH<sub>2</sub>], PBTA-5 [-N(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OCOCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] および PBTA-6 [-N(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH)<sub>2</sub>]) について検討した。検討した 6 種類の PBTA 類は全てヒト CYP1A1 によりほぼ特異的に活性化されて遺伝子変異を誘発した。

PBTA 類はベンゾトリアゾール環にアミノ基が結合していることからヘテロサイクリックアミン (HCA) 類の一種であると考えられる。HCA 類は、ヒトにおいては CYP1A2 により *N*-水酸化され、さらに *N*-アセチル転位酵素 2 (NAT2) により *O*-アセチル化されて活性化されると考えられている。申請者は PBTA 類の活性化にもヒト NAT2 が関与するか否かを検討し、これらの化学物質がヒト CYP1A1 による活性化に引き続きヒト NAT2 により活性化されることを明らかにした。

## 3. PBTA 類による CYP1A1 の発現の誘導

PBTA 類の活性化にほぼ特異的に関与した CYP1A1 は構成的には肝にほとんど発現していないが、多環芳香族炭化水素類などにより誘導されることが知られている。申請者は、PBTA 類が CYP1A1 の発現を誘導する場合、PBTA 類は誘導された CYP1A1 により代謝的に活性化される可能性があると考えた。申請者は 3 種類の PBTA 類 (PBTA-1, PBTA-2 および PBTA-6) およびヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用い、PBTA 類 (0.1-1 μM) が CYP1A1 mRNA の発現を転写レベルで誘導することを明らかにした。PBTA 類による CYP1A1 の誘導機構は既知の CYP1A1 の誘導機構と同様であった。さらに、PBTA-6 を混餌投与 (400-600 ppm) されたラットの肝において CYP1A1 mRNA の発現量が対照の約 2.4-3.5 倍に上昇することを見出した。

以上、本研究では、新規変異原物質 PBTA 類がヒトの体内で代謝的に活性化されて遺伝子変異を誘発する可能性を示した。これらの結果は PBTA 類がヒトにおいて発がんリスクになる可能性を示唆するものである。本論文『河川水から単離された変異原物質 2-フェニルベンゾトリアゾール (PBTA) 類のヒトにおける発がんリスクの予測: ヒト CYP1A1 の役割を中心として』に含まれる研究結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。