

薬物代謝酵素活性における量的変動機構の解明

: *N*-グルコース抱合酵素活性を例として

学位論文内容の要旨

1. はじめに

ヒト肝に存在する薬物代謝酵素活性には個人差が存在し、その多くは酵素をコードする遺伝子の変異により説明することが可能である。しかし、酵素活性に著しい個人差が存在しながら、その遺伝子上に個人差を説明し得る明確な遺伝子変異が存在しない例も多い。

N-グルコース抱合はバルビツール酸類の主代謝経路であり、その酵素活性には 40 倍以上の個人差が存在する。しかし、本抱合反応に関与する酵素は明らかにされておらず、個人差の原因などは全く解明されていない。そこで本研究では *N*-グルコース抱合酵素活性を中心に、薬物代謝酵素活性の個人差の原因を解明することを目的とした。

2. AS-3201 *N*-グルコース抱合に関与する酵素の同定

新規アルドース還元酵素阻害薬 AS-3201 のヒトにおける主代謝経路は、*N*-グルコース抱合および *N*-グルクロン酸抱合であることが明らかになっている。これら抱合反応は、UDP-グルコースまたは UDP-グルクロン酸を co-factor として利用し、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) によって触媒される薬物代謝反応である。UGT には機能の異なる複数の分子種が存在するため、まず、これらの抱合に関与する UGT 分子種の同定を試みた。

ヒト肝マイクロゾームを用いて AS-3201 およびバルビツール酸を代謝させた結果、AS-3201 *N*-グルコース抱合とバルビツール酸 *N*-グルコース抱合に関与する酵素が同一のものであることが明らかになった。また、UGT 発現系を用いた検討の結果、*N*-グルコース抱合酵素活性は UGT1A1, 1A3, 1A4, 2B7 および 2B15 に認められ、ヒト肝マイクロゾームにおいて UGT2B7 および UGT2B15 が主に関与していることが示唆された。同様に AS-3201 *N*-グルクロン酸抱合酵素活性を測定したところ、UGT2B 分子種に本抱合酵素活性は存在せず、UGT1A 分子種によって特異的に触媒された。したがって、同一の基質でありながら、co-factor によって抱合を触媒する UGT 分子種が異なることが示唆された。以上の結果から、AS-3201 *N*-グルコース抱合はヒト肝マイクロゾームにおいて主に UGT2B7 および UGT2B15 によって触媒される事が示された。

3. UGT2B7 酵素活性における個人差

UGT2B7 はモルヒネ等の代謝に関与する UGT 分子種であるが、その酵素活性には 10 倍以上の個人差が存在する。この個人差が UGT2B7 遺伝子の変異により説明し得るか否か検証するため、UGT2B7 遺伝子に存在する遺伝子変異の UGT2B7 酵素活性または酵素発現量に及ぼす影響を検討した。その結果、遺伝子変異により酵素活性、酵素発現量は共に

変化せず、*UGT2B7* 遺伝子上に存在する変異により酵素活性の個人差は説明できないことが明らかになった。また、ヒト肝検体中の *UGT2B7* mRNA 発現量を定量したところ、発現量に 10 倍以上の個人差が認められ、酵素活性の個人差はその発現量に起因する可能性が示唆された。薬物代謝酵素の発現量が変動する要因として、転写調節領域に存在する遺伝子変異以外に転写調節因子の変異または量的変化による転写活性の変化が考えられる。*UGT2B7* は肝における発現が *HNF-1α* によって調節されているため、*HNF-1α* に変異が存在する場合発現量が低下すると考えられるが、今回検討した肝検体中から *HNF-1α* に遺伝子変異は検出されなかった。しかし、*HNF-1α* mRNA 発現量を定量したところ、約 10 倍の個人差が存在した。また、その発現量は *UGT2B7* mRNA 発現量と有意に ($r=0.786, p=0.002$) 相関しており、ヒト肝において *HNF-1α* 発現量が *UGT2B7* 発現量を規定している事が示された。したがって、*UGT2B7* 酵素活性の個人差の原因はその遺伝子上に存在しているのではなく、転写調節因子である *HNF-1α* 発現量の個人差に起因していることが示唆された。

4. *UGT2B15* 酵素活性における個人差

UGT2B15 はヒト肝に発現する主要な *UGT* 分子種の一つであり、ステロイド類の代謝に関与している。*UGT2B15* の酵素活性には 10 倍以上の個人差が存在するが、*UGT2B15* 遺伝子に個人差の原因となる変異は存在しなかった。また、ヒト肝における *UGT2B15* mRNA 発現量を定量したところ、発現量に 100 倍以上の個人差が認められ、酵素活性の個人差はその発現量に起因する可能性が示唆された。次に *UGT2B15* 遺伝子のヒト肝における転写調節機構を *UGT2B15* 遺伝子 5' 上流およびヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いて検討した。その結果、*UGT2B15* 遺伝子は *HNF-1α* および *HNF-3β* により活性化されることが示された。これら転写調節因子のヒト肝における発現量を定量した結果、共に 10 倍以上の個人差が存在した。また、これら転写調節因子のヒト肝における発現量と *UGT2B15* mRNA 発現量との関連性を重回帰分析により解析したところ、*UGT2B15* mRNA 発現量は *HNF-1α* および *HNF-3β* mRNA 発現量と有意に相関しており ($r=0.747, p<0.05$)、ヒト肝における *UGT2B15* mRNA の発現量がこれら転写因子の発現量に規定されていることが示唆された。したがって、*UGT2B15* 酵素活性の個人差の原因はその遺伝子上に存在しているのではなく、転写調節因子である *HNF-1α* および *HNF-3β* 発現量の個人差に起因していることが示唆された。

5. まとめ

以上、本研究により *N*-グルコース抱合に関与する酵素は *UGT2B7* および *UGT2B15* であること、それぞれの酵素活性の個人差はこれらをコードする遺伝子の変異により説明できないことが明らかになった。さらに、酵素活性の個人差は、酵素の量的な変化によるものであること、また、その発現量の個人差は転写因子である *HNF-1α* および *HNF-3β* 発現量の個人差に由来することが示された。*HNF-1α* および *HNF-3β* は肝に豊富に存在する転写調節因子であり、様々な薬物代謝酵素の肝における転写調節に寄与している。したがって本研究によって得られた知見はこれら *UGT* 分子種のみならず、多くの薬物代謝酵素発現量の個人差を理解する一助になるものと思われる。

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

薬物代謝酵素活性における量的変動機構の解明 ： *N*-グルコース抱合酵素活性を例として

ヒト肝に存在する薬物代謝酵素活性には個人差が存在し、その多くは酵素をコードする遺伝子の変異により説明することが可能である。しかし、酵素活性に著しい個人差が存在しながら、その遺伝子上に個人差を説明し得る明確な遺伝子変異が存在しない例も多い。本研究では、バルビツール酸類の主代謝経路である *N*-グルコース抱合酵素活性を中心に、薬物代謝酵素活性の個人差の原因を解明した。本研究で得られた知見は、薬物代謝酵素活性の個人差の予測、ひいてはテーラーメイド医療など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) AS-3201 *N*-グルコース抱合に関与する酵素の同定

新規アルドース還元酵素阻害薬 AS-3201 のヒトにおける主代謝経路は、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) によって触媒される *N*-グルコース抱合および *N*-グルクロン酸抱合である。ヒト肝ミクロゾームを用いて AS-3201 およびバルビツール酸を代謝させた結果、AS-3201 *N*-グルコース抱合とバルビツール酸 *N*-グルコース抱合に関与する酵素が同一のものであることが明らかになった。また、UGT 発現系を用いた検討の結果、*N*-グルコース抱合は UGT2B7 および UGT2B15 により触媒されることが示唆された。一方、AS-3201 *N*-グルクロン酸抱合酵素活性は、UGT2B 分子種には存在せず、UGT1A 分子種によって特異的に触媒された。したがって、同一の基質でありながら、co-factor によって抱合を触媒する UGT 分子種が異なることが示唆された。以上の結果から、AS-3201 *N*-グルコース抱合はヒト肝ミクロゾームにおいて主に UGT2B7 および UGT2B15 によって触媒される事が示された。

(2) UGT2B7 酵素活性における個人差

UGT2B7 はモルヒネ等の代謝に関与する UGT 分子種であるが、その酵素活性には 10 倍以上の個人差が存在する。しかし、翻訳領域または転写調節領域に存在する遺伝子変異により酵素活性、酵素発現量は共に変化せず、UGT2B7 遺伝子上に存在する変異により酵素活性の個人差は説明できないことが明らかになった。また、ヒト肝検体中の UGT2B7 mRNA 発現量を定量したところ、発現量に 10 倍以上の個人差が認められ、酵素活性の個人差はその発現量に起因する可能性が示唆された。この発現量は UGT2B7 遺伝子の転写調節因子である HNF-1 α mRNA 発現量と有意に相関しており、ヒト肝において HNF-1 α 発現量が UGT2B7 発現量を規定している事が示された。

(3) UGT2B15 酵素活性における個人差

UGT2B15 の酵素活性には 10 倍以上の個人差が存在するが、UGT2B15 遺伝子に個人差の原因となる変異は存在しなかった。また、ヒト肝における UGT2B15 mRNA 発現量を定量したところ、発現量に 100 倍以上の個人差が認められ、酵素活性の個人差はその発現量に起因する可能性が示唆された。また、UGT2B15 遺伝子のヒト肝における転写調節機構を検討した結果、UGT2B15 遺伝子は HNF-1 α および HNF-3 β により活性化されることが示された。これら転写調節因子のヒト肝における発現量には 10 倍以上の個人差が存在しており、その発現量は UGT2B15 発現量と有意に相関していた。したがって、UGT2B15 酵素活性の個人差の原因はその遺伝子上に存在しているのではなく、転写調節因子である HNF-1 α および HNF-3 β 発現量の個人差に起因していることが示唆された。

以上、*N*-グルコース抱合を中心として、薬物代謝酵素活性の個人差がその遺伝子上に存在するのではなく、転写調節因子である HNF-1 α および HNF-3 β 発現量の個人差に由来することを示した。HNF-1 α および HNF-3 β は肝に豊富に存在する転写調節因子であり、様々な薬物代謝酵素の肝における転写調節に寄与している。したがって本研究によって得られた知見は、多くの薬物代謝酵素発現量の個人差を理解する一助になるものと期待される。本論文『薬物代謝酵素活性における量的変動機構の解明: *N*-グルコース抱合酵素活性を例として』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。