

学 位 論 文 題 名

ヒトと実験動物の CYP2A の
タバコ関連発がんにおける役割に関する研究

学位論文内容の要旨

1. はじめに

遺伝子の突然変異が発がんの引き金 (発がんのイニシエーション) であることは広く認識されている。変異を引き起こす原因の多くは環境中の変異原・がん原物質に帰するとされている。肺はタバコ煙中に含まれる変異原・がん原物質を含む約 4000 種類の化学物質に、最初に (ゆえに高濃度で) 暴露される器官であるので、肺がんは喫煙との因果関係が最も深いと考えられる。タバコ煙中の変異原・がん原物質のうち最も代表的なものの 1 つに、喫煙過程や製造過程でニコチンから生成するタバコ煙特異的かつ強力ながん原性 *N*-ニトロソアミン類である 4-(メチルニトロソアミノ)-1-(3-ピリジル)-1-ブタンोन (NNK) などがある。NNK などのタバコ関連 *N*-ニトロソアミン類は CYP によって代謝的に活性化されて究極発がん物質となり、初めて遺伝子を構成する DNA を修飾する能力を獲得する。

CYP2A6 は、ヒト CYP2A サブファミリーに属する分子種のうちの 1 つであり、肺および肝に発現している。CYP2A6 は NNK などのタバコ煙中の主要ながん原性 *N*-ニトロソアミン類を変異原活性化することがこれまでの当研究室における検討により明らかにされている。このこととマウス、ラットおよびハムスターなどの実験動物に NNK を投与すると肺に効率よくがんが誘発される事実を併せて考察すると、NNK などのタバコ煙中の *N*-ニトロソアミン類による肺がんの誘発には CYP2A がヒトと実験動物に共通して関与している可能性が考えられた。

そこで本研究では、ヒトと実験動物の CYP2A のタバコ関連発がんにおける役割を解明することを目的とした。

2. ヒトと実験動物に存在する CYP2A によるタバコ関連 *N*-ニトロソアミン類の変異原活性化

変異原・がん原物質の代謝的な活性化や発がんにおける CYP の毒性学的な役割を *in vivo* にて検討するには実験動物の使用が必要不可欠である。しかしながら、CYP の性質および発現臓器分布には、種差が存在しており、同一のサブファミリーに属する分子種においても動物種によって異なることが知られている。したがって、ヒトと実験動物に存在する CYP2A のタバコ関連 *N*-ニトロソアミン類の変異原活性化における毒性学的役割を比較検討することは重要である。

そこで、マウス、ラット、ハムスターおよびヒトの CYP2A のそれぞれとヒト NADPH-CYP 還元酵素を同時に発現するサルモネラ菌 YG7108 株を用いて、タバコ煙中の 7 つの主要ながん原性 *N*-ニトロソアミン類に対して変異原性試験を実施した。その結果、マウス CYP2A4 および CYP2A5、ラット CYP2A3、ハムスター CYP2A16 およびヒト CYP2A13 は検討した *N*-ニトロソアミン類のうちとりわけ NNK を nM レベルの低濃度にて効率よく活性化した (見かけの $K_m=66-260$ nM)。また、NNK に対する実験動物とヒトの CYP2A の活性化能 ($V_{max}/K_m=2200-9700$) は他の *N*-ニトロソアミン類 ($V_{max}/K_m=0.0037-10$) と比較して極めて高かった。以上の結果から、実験動物とヒトの肺に発現しているこれらの CYP2A が NNK を変異原活性化して、肺がんの誘発に寄与している可能性が示唆された。

3. ニコチン代謝におけるヒトと実験動物に存在する CYP2A の役割

ニコチンはタバコの主要毒性成分の 1 つである。CYP2A6 はニコチンの主代謝反応であるニコチン α 酸化反応を触媒する主要酵素である。このことと、ヒトはニコチンの血中濃度を維持しようとして喫煙することから、CYP2A6 を阻害すればニコチンの体内からの消失が遅延し、喫煙量が低下し、変異原・発がん物質への暴露量が減少し発がんの予防につながると考えられる。そこで、ニコチン代謝におけるモデル動物を見出すため、マウスにおけるニコチン α 酸化反応の主要触媒酵素を明らかにし、ヒトとラットと比較した。CYP2A の代表的な阻害物質であるメトキサレンの添加により、マウスとヒト肝ミクロゾームによるニコチン α 酸化反応はその濃度依存的に阻害されたが、ラットでは阻害されなかった。マウス CYP2A4 および CYP2A5 による同反応に対する K_m および V_{max} 値はヒト CYP2A6 を用いた場合と概ね同程度であったが、一方、ラット肝に発現する CYP2A は同反応を触媒しなかった。これらの結果から、マウスではヒトと同様に CYP2A がニコチン α 酸化反応における主要代謝酵素であり、ラットでは関与する CYP 分子種が異なることが明らかとなった。

4. NNK の変異原活性化におけるマウス CYP2A の役割

マウスは NNK により誘発される肺発がんに対する化学予防の検討で汎用されている実験動物モデルでもある。そこで、生体での NNK の変異原活性化における CYP2A の役割についてマウスを用いてさらに詳細に検討した。(1) マウス臓器ミクロゾームをサルモネラ菌 YG7108 株の菌体外に添加した Ames 試験、(2) RT-PCR によるマウス肺における各 CYP 分子種の発現の有無に関する検討、および (3) CYP2A4, CYP2A5 および CYP2B10 のそれぞれと OR を発現するサルモネラ菌 YG7108 株を用いた変異原性試験の結果、NNK の発がん標的臓器である肺における NNK の変異原活性化には、主として CYP2A が関与することが分かった。さらに、CYP2A の代表的な阻害物質であるメトキサレンの前投与により、マウス生体内における *in vivo* での CYP2A (ニコチン α 酸化酵素活性) および NNK の投与によって *gpt delta* トランスジェニックマウスの肺および肝に誘発された遺伝子突然変異が阻害された。これらの項目を検討して得られた結果から、CYP2A はマウスにおける NNK の変異原活性化、すなわち発がんのイニシエーションにおいて重要な役割を果たしていることが示唆された。

5. CYP2A 阻害物質メトキサレンの NNK 誘発マウス肺腫瘍の発症に及ぼす影響

メトキサレンの前投与が実際に NNK 誘発マウス肺腫瘍の発症に影響を及ぼすか否かを検討した。その結果、マウスの肺に NNK の投与によって誘発された腫瘍がメトキサレンの前投与によってその投与量に依存して抑制された。また、免疫組織化学染色の結果から、NNK によって誘発された肺腫瘍部位において CYP2A が高発現していることが明らかとなった。以上の一連の検討結果から、CYP2A の触媒活性が NNK の投与によって誘発されるマウス肺腫瘍の発症に重要な役割を果たしていることが示唆された。

6. まとめ

本研究を通して、以下の新規な知見を得た。

- 1) ヒトと実験動物の肺に存在する CYP2A はタバコ煙中に存在する主要ながん原性 *N*-ニトロソアミン類のうち、とりわけ、NNK を極めて効率よく変異原活性化した。
- 2) マウス CYP2A はヒト CYP2A と同様にニコチン代謝の主要酵素であり、ラットでは関与する CYP 分子種が異なった。
- 3) マウス生体内における NNK の変異原活性化には CYP2A の酵素活性が重要であった。
- 4) CYP2A は NNK 誘発マウス肺腫瘍の発症において重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上、本研究によって CYP2A による NNK の代謝的な活性化の阻害がタバコ関連肺発がんに対する化学予防の新規な分子標的になり得ることを明らかにした。マウスはヒト CYP2A を阻害する候補化合物のタバコ関連発がんの化学予防を検討するためには優れた動物実験モデルであると期待される。

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

ヒトと実験動物の CYP2A の タバコ関連発がんにおける役割に関する研究

遺伝子の突然変異が発がんの引き金であることは広く認識されている。変異を引き起こす原因の多くは環境中の変異原・がん原物質に帰するとされている。肺はタバコ煙中に含まれる変異原・がん原物質を含む約 4000 種類の化学物質に、最初にゆえに高濃度にて暴露される器官であるので、肺がんは喫煙との因果関係が最も深いと考えられる。タバコ煙中の変異原・がん原物質のうち最も代表的なものの 1 つに、喫煙過程や製造過程でニコチンから生成するタバコ煙特異的かつ強力ながん原性 *N*-ニトロソアミン類である 4-(メチルニトロソアミノ)-1-(3-ピリジル)-1-ブタノン (NNK) などがある。NNK などのタバコ関連 *N*-ニトロソアミン類はヒト CYP2A6 によって代謝的に活性化されて、遺伝子の突然変異を誘発することがこれまでの当研究室における *in vitro* 試験により明らかにされている。このこととマウス、ラットおよびハムスターなどの実験動物に NNK を投与すると肺に効率よくがんが誘発される事実とを併せて考察すると、NNK などのタバコ煙中の *N*-ニトロソアミン類による肺がんの誘発には CYP2A がヒトと実験動物に共通して関与している可能性が考えられた。

そこで本研究では、ヒトと実験動物の CYP2A のタバコ関連発がんにおける役割を解明することを目的とした。

1. ヒトと実験動物に存在する CYP2A によるタバコ関連 *N*-ニトロソアミン類の変異原活性化

CYP の性質および発現臓器分布には、種差が存在しており、同一のサブファミリーに属する分子種においても動物種によって異なることが知られている。したがって、ヒトと実験動物に存在する CYP2A のタバコ関連 *N*-ニトロソアミン類の変異原活性化における毒性学的役割を比較検討することは重要である。そこで、マウス、ラット、ハムスターおよびヒトの CYP2A のそれぞれとヒト NADPH-CYP 還元酵素を同時に発現するサルモネラ菌 YG7108 株を用いて、タバコ煙中の 7 つの主要ながん原性 *N*-ニトロソアミン類に対して変異原性試験を実施した。その結果、マウス CYP2A4 および CYP2A5、ラット CYP2A3、ハムスター

CYP2A16 およびヒト CYP2A13 は検討した *N*-ニトロソアミン類のうちとりわけ NNK を nM レベルの低濃度にて効率よく活性化した。また、NNK に対する実験動物とヒトの CYP2A の活性化能は他の *N*-ニトロソアミン類と比較して極めて高かった。以上の結果から、実験動物とヒトの肺に発現しているこれらの CYP2A が NNK を変異原活性化して、肺がんの誘発に寄与している可能性が示唆された。

2. NNK の変異原活性化におけるマウス CYP2A の役割

マウスは NNK により誘発される肺発がんに対する化学予防の検討で汎用されている実験動物モデルである。そこで、生体での NNK の変異原活性化における CYP2A の役割についてマウスを用いてさらに詳細に検討した。(1) マウス臓器マイクロゾームをサルモネラ菌 YG7108 株の菌体外に添加した Ames 試験, (2) RT-PCR によるマウス肺における各 CYP 分子種の発現の有無に関する検討, および (3) CYP2A4, CYP2A5 および CYP2B10 のそれぞれと OR を発現するサルモネラ菌 YG7108 株を用いた変異原性試験の結果, NNK の発がん標的臓器である肺における NNK の変異原活性化には、主として CYP2A が関与することが分かった。さらに、CYP2A の代表的な阻害物質であるメキシサレンの前投与により、NNK の投与によって *gpt delta* トランスジェニックマウスの肺に誘発された遺伝子突然変異が阻害された。これらの結果から、CYP2A は NNK 誘発肺発がんのイニシエーションにおいて重要な役割を果たしていることが示唆された。

3. CYP2A 阻害物質メキシサレンの NNK 誘発マウス肺腫瘍の発症に及ぼす影響

メキシサレンの前投与が実際に NNK 誘発マウス肺腫瘍の形成に影響を及ぼすか否かを検討した。その結果、マウスの肺に NNK の投与によって誘発された腫瘍がメキシサレンの前投与によってその投与量に依存して抑制された。また、免疫組織化学染色の結果から、NNK によって誘発された肺腫瘍部位において CYP2A が高発現していることが明らかとなった。以上の一連の検討結果から、CYP2A の触媒活性が NNK の投与によって誘発されるマウス肺腫瘍の発症に重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上、本研究によって CYP2A による NNK の代謝的活性化の阻害がタバコ関連肺発がんに対する化学予防の新規な分子標的になり得ることを明らかにした。本研究によって得られた知見は、タバコ関連肺発がんの基盤情報として有用であり、タバコ関連発がんの予防医学に十分に貢献できることが示された。本論文『ヒトと実験動物の CYP2A のタバコ関連発がんにおける役割に関する研究』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た。