

日本人肝に発現する CYP3A5 の薬物代謝における 役割に関する研究

学位論文内容の要旨

医薬品は、効果的かつ安全な作用を発揮するために適正に使用されなければならない。しかしながら、医薬品に対する応答性には大きな個人差が存在し、全ての患者に適切な効果が得られるか否かを予測することは困難である。このような薬物応答性の個人差を引き起こす原因の一部は薬物代謝酵素の遺伝子多型によって引き起こされる薬物代謝の個人差であると考えられている。

チトクローム P450 (P450) は最も重要な薬物代謝酵素群であり、薬物代謝反応全体の約 65% に関与している。薬物代謝に関与するヒト P450 のうち、肝に最も多く発現しているのは CYP3A 分子種である。CYP3A4 は成人肝に発現する主要な P450 分子種であり、多くの薬物の代謝に関与している。CYP3A7 は胎児肝に発現する主要な P450 分子種であり、胎児期における解毒代謝に深く関わっている。一方、CYP3A5 は成人および胎児の肝に発現する P450 分子種であるが、これまで薬物代謝の評価はほとんど行われていない。成人肝における CYP3A の酵素活性には大きな個人差が存在することが報告されているが、その原因については未だ明らかにされていない。

CYP3A5 は遺伝的多型を示し、主に CYP3A5*1 (野生型) および*3 (酵素欠損型) から構成されている。これらの遺伝子型の頻度には人種差が報告されており、CYP3A5 の発現の個人差は人種間で異なる可能性が考えられる。これまで、成人肝の総 CYP3A 含量に占める CYP3A5 の割合は低いと考えられていた。しかし、最近、一部の成人肝において、CYP3A5 が CYP3A4 に匹敵する量を発現していることが報告され、CYP3A5 の発現量には大きな個人差が存在することが明らかになった。また、欧米白人およびアフリカ系アメリカ人の肝に発現する CYP3A5 がミダゾラムの代謝に寄与することが報告され、本酵素がミダゾラムの代謝における大きな個人差を説明する 1 つの要因となり得ることが示唆された。しかしながら、日本人肝での薬物代謝における CYP3A5 の役割については明らかにされていない。

そこで本研究では、日本人肝に発現する CYP3A5 の薬物代謝における役割を明らかにすることを目的とした。

第 I 章においては、CYP3A5 の触媒機能を明らかにするために、CYP3A5 と NADPH-P450 還元酵素 (CPR) を同時に発現する大腸菌株を樹立することを目的とした。大腸菌で発現しやすく 5'-末端領域を改変した CYP3A5 cDNA を CPR cDNA とともに pCW に組み込み、同時発現プラスミド pCYP3A5/CPR を構築した。pCYP3A5/CPR を大腸菌 DH5 α 株に導入し、CYP3A5 および CPR を同時に発現する大腸菌株を樹立した。大腸菌に発現した

CYP3A5 はミダゾラム 1'-水酸化酵素活性を示したことから、CYP3A5 と CPR を同時に発現する大腸菌株の樹立に成功した。

第 II 章においては、第 I 章で樹立した CYP3A5 の大腸菌発現系を用いて、CYP3A5 の触媒機能を解析した。まず、ヒトチトクローム b_5 (b_5) を発現する大腸菌株を樹立し、得られた菌株よりヒト b_5 を精製した。CYP3A5 の酵素活性は検討した 17 種類の代謝反応のうち約半数でヒト b_5 の添加により上昇したことから、CYP3A5 が触媒機能を充分に発揮するためには CPR だけでなく b_5 も必要であることが明らかとなった。また、CYP3A5 および CYP3A4 の酵素活性に及ぼす b_5 添加効果は CYP3A7 と異なることが示された。CPR および b_5 存在下における各 CYP3A 分子種の酵素活性を比較したところ、検討した 17 種類の代謝反応のうち約 1/3 の反応において、CYP3A5 の酵素活性が他の CYP3A 分子種に比べて高いことが示された。これまで、CYP3A5 が主要な代謝酵素となる触媒反応はミダゾラム 1'-水酸化反応のみであったが、本章で得られた結果から、CYP3A5 が CYP3A4 や CYP3A7 に比べて高い活性を示す代謝反応を数多く見出した。

第 III 章においては、日本人肝に発現する CYP3A5 が薬物代謝にどの程度寄与するのかを明らかにすることを目的とした。薬物代謝における CYP3A5 の寄与を推測するためには、CYP3A5 の単位酵素量当たりの活性に加えて、発現量も考慮する必要がある。そこで、日本人肝ミクロゾームを用いて、CYP3A5 の発現量をウェスタンブロット分析により定量した。また、リアルタイム PCR 法による CYP3A5 遺伝子型の判定法を開発し、これらの肝サンプルにおける CYP3A5 遺伝子型を判定した。CYP3A5*1 アリルを有するヒトの肝における CYP3A5 の発現量は CYP3A5 と CYP3A4 の各含量の総和の 20-60% を占めていることが明らかとなった。また、これらの日本人肝ミクロゾームに発現する CYP3A5 は、ジルチアゼム N-脱メチル化、ミダゾラム水酸化およびテストステロン 6 β -水酸化反応に関与することが示唆された。さらに、これらの代謝に対する CYP3A5 の寄与は CYP3A4 と同程度またはそれ以上であることが示された。これらの結果から、日本人の肝に発現する CYP3A5 は薬物代謝における大きな個人差の一要因となることが示唆された。

第 IV 章においては、日本人肝における CYP3A5、CYP3A4 および CYP3A7 の発現量の個人差および人種差を明らかにすることを目的とした。そこで、ヒト CYP3A mRNA の発現量を特異的かつ高感度に定量できるリアルタイム RT-PCR 法を開発した。本定量法を用いて各ヒト CYP3A 分子種の発現量を測定した。CYP3A5 においては CYP3A5*1/*3 を有するヒトの肝で、CYP3A4 においては検討した全ての肝で、また CYP3A7 においては CYP3A7*1A/*1A を有するヒトの肝で、各ヒト CYP3A mRNA は日本人の方が欧米白人に比べて高発現していた。さらに、欧米白人の肝において、CYP3A5、CYP3A4 および CYP3A7 の発現量は相互に相関したが、日本人肝においては、これらの CYP3A 分子種の発現量の間に有意な相関は認められなかった。これらの結果から、日本人と欧米白人の肝で CYP3A5、CYP3A4 および CYP3A7 の発現における個人差の分子機構は人種間で異なる可能性が示唆された。

以上、CYP3A5 はジルチアゼムおよびミダゾラムを含む多くの薬物を CYP3A4 に比べてより効率的に代謝し、少なくとも日本人の肝では CYP3A5 がこれらの代謝に大きく寄与する可能性が考えられた。また、肝における CYP3A5 の発現量の個人差は CYP3A の酵素活性の大きな個人差に一部寄与することが考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	鎌 滝 哲 也
副査	教授	宮 崎 勝 巳
副査	助教授	菅 原 満
副査	助教授	山 崎 浩 史

学位論文題名

日本人肝に発現する CYP3A5の薬物代謝における 役割に関する研究

チトクローム P450 (CYP) 3A5 は主に成人肝に発現する CYP3A 分子種であり, その発現量には大きな個人差が存在する. しかし, CYP3A5 が日本人肝における CYP3A の酵素活性の大きな個人差を説明する要因となり得るかは不明である. 本研究では, 日本人肝に発現する CYP3A5 の薬物代謝における役割を解明した. 本研究で得られた知見は, CYP3A の酵素活性における個人差の予測, ひいてはテーラーメード医療などに有用な概念を提示するものであり, 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)CYP3A5 と NADPH-P450 還元酵素 (CPR) を同時に発現する大腸菌株の樹立

CYP3A5 の触媒機能を明らかにする目的から, 大量の酵素を効率的に得ることができる大腸菌発現系の構築を行った. CYP3A5 cDNA を, P450 への電子伝達に関与する CPR の cDNA とともに pCW に組み込み, 同時発現プラスミド pCYP3A5/CPR を構築した. このプラスミドを大腸菌 DH5 α 株に導入したところ, CYP3A5 および CPR を同時に発現する大腸菌株を得, さらに CYP3A5 はミダゾラム 1'-水酸化酵素活性を示した. 以上の結果から, CYP3A5 と CPR を同時に発現する大腸菌株の樹立に成功した.

(2)CYP3A5 の触媒機能の解析

樹立した CYP3A5 の大腸菌発現系を用いて, 本酵素の触媒機能を解析した. ヒトチトクローム b_5 (b_5) の添加による酵素活性の上昇は, 検討した 17 種類の代謝反応のうち約半数で示されたことから, CYP3A5 が触媒機能を十分に

発揮するためには CPR だけでなく b_5 も必要であることが明らかとなった。また、CYP3A5 の酵素活性に及ぼす b_5 の添加効果は CYP3A4 と同様であり、CYP3A7 と異なることが示された。これまで、CYP3A5 が主要な代謝酵素となる触媒反応はミダゾラム 1'-水酸化反応のみであったが、CPR および b_5 存在下における各 CYP3A 分子種の酵素活性の比較から、CYP3A5 が CYP3A4 や CYP3A7 に比べて高い活性を示す代謝反応を数多く見出した。

(3)日本人肝における CYP3A5 の薬物代謝への寄与

日本人の CYP3A5 遺伝子型は、主に CYP3A5*1 (野生型) および*3 (酵素欠損型) アリルから構成されている。日本人の肝に発現する CYP3A5 のタンパク質含量は CYP3A5 遺伝子型に依存して大きな個人差を示し、CYP3A5*1 アリルを有するヒトの肝においては総 CYP3A 含量の中で高い割合を占めていた。また、CYP3A5*1 アリルを有する日本人の肝ミクロゾームにおいて、CYP3A5 がジルチアゼム、ミダゾラムおよびテストステロンの代謝に寄与し、その程度は CYP3A4 と同等またはそれ以上であった。これらの結果から、日本人の肝に発現する CYP3A5 は薬物代謝における大きな個人差の一要因となることが示唆された。

(4)日本人肝における CYP3A5、CYP3A4 および CYP3A7 mRNA の発現量の個人差および人種差

日本人および欧米白人の肝における CYP3A5、CYP3A4 および CYP3A7 mRNA の発現量は少なくとも 40 倍の個人差を示した。また、これらの mRNA 量はそれぞれ CYP3A5*1/*3 を有するヒトの肝、検討した全ての肝および CYP3A7*1A/*1A を有するヒトの肝で、日本人の方が欧米白人に比べて高発現していた。さらに、欧米白人の肝において、各 CYP3A 分子種の発現量は相互に相関したが、日本人肝においては有意な相関は認められなかった。以上の結果から、日本人と欧米白人の肝で CYP3A5 をはじめとする各 CYP3A 分子種の発現における個人差の分子機構は人種間で異なる可能性が示された。

以上、CYP3A5 はジルチアゼムおよびミダゾラムを含む多くの薬物を CYP3A4 に比べてより効率的に代謝し、少なくとも日本人の肝では CYP3A5 がこれらの代謝に大きく寄与することが示唆された。したがって、本研究によって得られた知見は、ヒト肝における CYP3A の酵素活性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『日本人肝に発現する CYP3A5 の薬物代謝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。