

学位論文題名

遺伝子多型解析に基づく CYP2A6 の個人差に関する研究

学位論文内容の要旨

ヒトチトクローム P450 (CYP) 2A6 はクマリン 7-水酸化酵素として同定された薬物代謝酵素であり、ニコチンの主要代謝酵素のひとつでもある。当研究室の検討で、CYP2A6 遺伝子をホモおよびヘテロで欠損する喫煙者では、有意に肺がんおよび大腸腫瘍のリスクが低いことを明らかにしており、最近になって、CYP2A6 は毒性学的に大変重要な酵素であると考えられてきている。また、テガフル、ファドロゾールおよびバルプロ酸などの臨床で用いられる薬物の代謝にも CYP2A6 が関与していることが報告され、臨床での CYP2A6 遺伝子多型の影響が注目されている。当研究室では、CYP2A6 遺伝子の全領域を完全に欠損する遺伝子多型 (CYP2A6*4) を含むいくつかの遺伝子多型を見出した。また、の *in vivo* でのクマリン 7-水酸化能の個人差と CYP2A6 遺伝子多型との関連を明らかにした。しかしながら、各遺伝子型に分類しても依然として個人差が認められる。この原因として、未知の CYP2A6 遺伝子多型が存在することが考えられる。そこで本研究では、CYP2A6 酵素活性に及ぼす CYP2A6 遺伝子多型の影響を明らかにすることを目的とした。

(1) 45 種類の新規 CYP2A6 遺伝子多型の発見

日本人 49 検体および欧米人 28 検体の肝臓試料よりゲノム DNA を調製した。調製したゲノム DNA より、CYP2A6 遺伝子の 5'-上流領域 -3.3 kb から 3'-非翻訳領域までの領域内の遺伝子多型をダイレクトシーケンス法により、網羅的に探索した。この領域内に 65 種類の遺伝子多型が存在しており、45 種類は新規 CYP2A6 遺伝子多型であった。5'-上流領域には 10 種類、エクソン領域には 11 種類 (4 種類はアミノ酸置換を伴う)、イントロン領域には 21 種類、3'-非翻訳領域には 4 種類の遺伝子多型が存在した。また、それらのハプロタイプ構造を決定し、日本人および欧米人における頻度を解析した。ハプロタイプ解析の結果、32 種類のハプロタイプが存在していた。特に、アミノ酸置換を伴う遺伝子多型を含むアリルはヒトチトクローム P450 アリル命名委員会により CYP2A6*13 — CYP2A6*16 と命名された (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2a6.htm>)。CYP2A6*13 — CYP2A6*16 のアリル頻度には人種差が存在することを明らかにした。

(2) ヒト肝における CYP2A6 の発現および酵素活性に及ぼす CYP2A6*9 の影響

第 I 章で CYP2A6 遺伝子型を判定し、CYP2A6*2, CYP2A6*7 および CYP2A6*11 アリルを有していなかった日本人 34 検体および欧米人 27 検体の肝臓試料より、全 RNA およびマイクロゾームを調製した。まず、リアルタイム PCR 法を用いた CYP2A6 mRNA の高感度かつ特異的な定量法を確立した。CYP2A6 遺伝子型を判定したヒトの肝における CYP2A6 mRNA 発現量を定量したところ、CYP2A6*1/*4, CYP2A6*1/*9 および CYP2A6*4/*9 を有するヒトの肝における CYP2A6 mRNA 発現量は CYP2A6*1/*1 のそれぞれ 58%, 69% および 21% であった。さらに、CYP2A6*1/*4, CYP2A6*1/*9 および CYP2A6*4/*9 を有するヒトの肝マイクロゾームにおけるクマリン 7-水酸化酵素活性は CYP2A6*1/*1 を有するヒトの肝マイクロゾームのそれぞれ 41%, 71% および 14% であった。また、クマリン 7-水酸化反応の速度論的解析を行なったところ、いずれの CYP2A6 遺伝子型を有するヒトの肝マイクロゾームにおいても CYP2A6 タンパク質量あたりの $V_{\max}$ 値およびクマリン 7-水酸化反応に対する K_m 値に差は認められなかった。以上の結果から、CYP2A6*9 アリルは CYP2A6 の発現量を低下させることにより、酵素活性を低下させることが明らかとなった。特に、CYP2A6*4 アリルと CYP2A6*9 アリルをヘテロ接合体で有する肝では著しく CYP2A6 の発現量および酵素活性が低下することも明らかとなった。

(3) 新規 CYP2A6 遺伝子多型の機能解析

大腸菌発現系を用いた検討で、CYP2A6.15 は CYP2A6.1 と比較してクマリン 7-水酸化反応に対する $V_{\max}$ 値が 64% であった。また、CYP2A6.16 のクマリン 7-水酸化反応に対する K_m 値は CYP2A6.1 の 2.4 倍であった。したがって、CYP2A6.15 および CYP2A6.16 のクマリン 7-水酸化反応に対する $V_{\max}/K_m$ 値は野生型のそれぞれ 60% および 44% であった。CYP2A6.16 における Arg203Ser により、クマリン 7-水酸化反応に対する K_m 値の上昇が認められた原因を明らかにするため、分子モデリングを構築し Arg203Ser による CYP2A6 の三次元構造の変化を検討した。Arg203 は活性部位の外側に存在しており、クマリンと直接相互作用できないことが示唆された。しかしながら、ドッキングシミュレーションの結果、Arg203Ser より Phe209 の位置が変化することにより、クマリンとの親和性が低下することを明らかにした。

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	菅	原		満

学位論文題名

遺伝子多型解析に基づく CYP2A6 の個人差に関する研究

ヒトチトクローム P450 (CYP) 2A6 はクマリン 7-水酸化酵素として同定された薬物代謝酵素であり、ニコチンの主要代謝酵素のひとつでもある。当研究室の検討で、CYP2A6 遺伝子をホモおよびヘテロで欠損する喫煙者では、有意に肺がんおよび大腸腫瘍のリスクが低いことを明らかにしており、最近になって、CYP2A6 は毒性学的に大変重要な酵素であると考えられてきている。また、テガフル、ファドロゾールおよびバルプロ酸などの臨床で用いられる薬物の代謝にも CYP2A6 が関与していることが報告され、臨床での CYP2A6 遺伝子多型の影響が注目されている。当研究室では、CYP2A6 遺伝子の全領域を完全に欠損する遺伝子多型 (CYP2A6*4) を含むいくつかの遺伝子多型を見出した。また、*in vivo* でのクマリン 7-水酸化能の個人差と CYP2A6 遺伝子多型との関連を明らかにした。しかしながら、各遺伝子型に分類しても依然として個人差が認められる。この原因として、未知の CYP2A6 遺伝子多型が存在することが考えられる。そこで本研究では、CYP2A6 酵素活性に及ぼす CYP2A6 遺伝子多型の影響を明らかにすることを目的とした。

(1) 45 種類の新規 CYP2A6 遺伝子多型の発見

日本人 49 検体および欧米人 28 検体の肝臓試料よりゲノム DNA を調製した。調製したゲノム DNA より、CYP2A6 遺伝子の 5'-上流領域 -3.3 kb から 3'-非翻訳領域までの領域内の遺伝子多型をダイレクトシーケンス法により、網羅的に探索した。この領域内に 65 種類の遺伝子多型が存在しており、45 種類は新規 CYP2A6 遺伝子多型であった。5'-上流領域には 10 種類、エクソン領域には 11 種類 (4 種類はアミノ酸置換を伴う)、イントロン領域には 21 種類、3'-非翻訳領域には 4 種類の遺伝子多型が存在した。また、それらのハプロタイプ構造を決定し、日本人および欧米人における頻度を解析した。ハプロタイプ解析の結果、32 種類のハプロタイプが存在していた。特に、アミノ酸置換を伴

う遺伝子多型を含むアリルはヒトチトクローム P450 アリル命名委員会により CYP2A6*13 — CYP2A6*16 と命名された (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2a6.htm>). CYP2A6*13 — CYP2A6*16 のアリル頻度には人種差が存在することを明らかにした.

(2) ヒト肝における CYP2A6 の発現および酵素活性に及ぼす CYP2A6*9 の影響

第 I 章で CYP2A6 遺伝子型を判定し, CYP2A6*2, CYP2A6*7 および CYP2A6*11 アリルを有していなかった日本人 34 検体および欧米人 27 検体の肝臓試料より, 全 RNA およびマイクロゾームを調製した. まず, リアルタイム PCR 法を用いた CYP2A6 mRNA の高感度かつ特異的な定量法を確立した. CYP2A6 遺伝子型を判定したヒトの肝における CYP2A6 mRNA 発現量を定量したところ, CYP2A6*1/*4, CYP2A6*1/*9 および CYP2A6*4/*9 を有するヒトの肝における CYP2A6 mRNA 発現量は CYP2A6*1/*1 のそれぞれ 58%, 69% および 21% であった. さらに, CYP2A6*1/*4, CYP2A6*1/*9 および CYP2A6*4/*9 を有するヒトの肝マイクロゾームにおけるクマリン 7-水酸化酵素活性は CYP2A6*1/*1 を有するヒトの肝マイクロゾームのそれぞれ 41%, 71% および 14% であった. また, クマリン 7-水酸化反応の速度論的解析を行なったところ, いずれの CYP2A6 遺伝子型を有するヒトの肝マイクロゾームにおいても CYP2A6 タンパク質量あたりの $V_{\max}$ 値およびクマリン 7-水酸化反応に対する K_m 値に差は認められなかった. 以上の結果から, CYP2A6*9 アリルは CYP2A6 の発現量を低下させることにより, 酵素活性を低下させることが明らかとなった. 特に, CYP2A6*4 アリルと CYP2A6*9 アリルをヘテロ接合体で有する肝では著しく CYP2A6 の発現量および酵素活性が低下することも明らかとなった.

(3) 新規 CYP2A6 遺伝子多型の機能解析

大腸菌発現系を用いた検討で, CYP2A6.15 は CYP2A6.1 と比較してクマリン 7-水酸化反応に対する $V_{\max}$ 値が 64% であった. また, CYP2A6.16 のクマリン 7-水酸化反応に対する K_m 値は CYP2A6.1 の 2.4 倍であった. したがって, CYP2A6.15 および CYP2A6.16 のクマリン 7-水酸化反応に対する $V_{\max}/K_m$ 値は野生型のそれぞれ 60% および 44% であった. CYP2A6.16 における Arg203Ser により, クマリン 7-水酸化反応に対する K_m 値の上昇が認められた原因を明らかにするため, 分子モデリングを構築し Arg203Ser による CYP2A6 の三次元構造の変化を検討した. Arg203 は活性部位の外側に存在しており, クマリンと直接相互作用できないことが示唆された. しかしながら, ドッキングシミュレーションの結果, Arg203Ser より Phe209 の位置が変化することにより, クマリンとの親和性が低下することを明らかにした.

以上, CYP2A6 酵素活性を低下させる新規遺伝子多型 (CYP2A6*15 および CYP2A6*16) を見出した. また CYP2A6*9 が CYP2A6 の酵素活性の個人差の一因となることを明らか

にした。これらの知見は CYP2A6 で代謝される薬物による薬物療法の個別化を計る上で大変重要な情報となる。本論文『遺伝子多型解析に基づく CYP2A6 の個人差に関する研究』に含まれる研究成果は今後の臨床薬学研究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) の学位を受けるに十分値するものと認めた。