

Title	ヒト薬物代謝酵素の発現および誘導の評価に関する研究 : CYP 3A 4 mRNAの定量的解析を中心に
Author(s)	隅田, 昭彦
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/41964
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏 名	すみ だ あき ひこ 隅 田 昭 彦
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 5 3 7 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成12年3月24日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学 位 論 文 名	ヒト薬物代謝酵素の発現および誘導の評価に関する研究 ～CYP3A4 mRNAの定量的解析を中心に～
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 東 純一 (副査) 教 授 田中 慶一 教 授 松田 敏夫 教 授 山口 明人

論 文 内 容 の 要 旨

来る21世紀はゲノム創薬の時代と言われており、各患者の遺伝子情報をもとに個人別の効果および副作用を予測しながら行う、いわゆるオーダーメイド医療が主となるとされる。個別の薬物代謝活性を非侵襲的に評価し、その情報を本人あるいは医療従事者に還元することもその一環であると考えられる。最近、ヒト *in vivo* 薬物代謝酵素活性を予測する手段として末梢血リンパ球の有用性を示唆する報告がされている。薬物により誘導される cytochrome P450(CYP) の肝臓での量的変動を、採血のみで末梢血リンパ球より明らかにしようという試みである。そこでまず、末梢血に発現している CYP 分子種を同定し、常在発現量の検討を行ったところ、estrogen の代謝に関与するとされる CYP 1B1 mRNA の高発現が認められ、全 CYP 3A mRNA 量も比較的高値を示した。末梢血リンパ球中 CYP 3A mRNA が誘導されるか否かを検討するため、実際に肝 CYP 3A4 を誘導することが知られている rifampicin (RFP) を服用した肺結核患者4名を対象に、薬剤服用前および服用9～12日目での末梢血リンパ球における全 CYP 3A mRNA 発現の変化を観察した。その結果、4名全員で投与前後において CYP 3A mRNA 発現量は変動しなかった。ちなみに、肝 CYP 3A 活性を反映するとされる尿中6β-hydroxycortisol/cortisol を測定したところ、服用6～10日後で服用前に比較して6～10倍上昇していた。次に、末梢血での誘導の有無をより直接的に証明するため、*in vitro* 全血培養系で検討を試みたが、CYP 3A mRNA の発現誘導は認められなかった。つまり、薬物代謝に最も寄与率の高い CYP 3A mRNA 発現は RFP により誘導されないことが *in vivo* および *in vitro* の系から明らかとなった。一方、末梢血リンパ球で高い発現を示した CYP 1B1 mRNA は全血培養の系で誘導剤(3-methylcholanthrene) に応答して顕著な誘導が認められたことから、末梢血リンパ球で mRNA 発現が誘導される分子種とされない分子種があるということが判明した。

薬剤による CYP 誘導の評価は阻害の評価よりも困難とされている。これは、内在性の CYP が誘導される培養細胞系がほとんど知られていないことが原因である。本来、正常肝細胞で酵素誘導を評価することが最良であるが、わが国では新鮮な生体肝の入手は必ずしも容易ではない。さらに、代謝酵素の発現誘導の程度には個体差が大きいことも知られており、肝細胞初代培養系では供給源ごとに薬物に対する応答性が異なることも問題点となる。また、ヒトで観察される誘導が動物種によっては全く認められないことがある。一例を挙げると、ヒトでは CYP 3A の強力な誘導薬である RFP が、ラット、マウスではほとんど誘導作用が認められないことである。この一要因として、当該酵素の転写活性化に関与する転写制御因子のアミノ酸配列中のリガンド結合領域が動物種により異なり、これが誘導

剤に対する応答性の相違に繋がることを示唆する報告もされている。このため、動物実験で得られた結果をヒトへ外挿することは困難である。薬物代謝分野においては特に種差の存在を認識し、可能なかぎりヒト組織を用いて検討する必要がある。そこで申請者は、肝実質細胞の特性を良く維持しているとされる、ヒト肝癌由来 HepG 2 細胞株に着目した。HepG 2 細胞は肝特異的機能である血漿蛋白の産生などヒト正常肝の形質を良く維持している細胞株であるが、CYP の活性低下が認められる。薬物代謝酵素の誘導とは本来、種々の誘導因子への暴露により酵素の蛋白質量が増加する現象である。したがって、CYP 1 A 以外の薬物代謝酵素においては、酵素蛋白あるいは活性の検出が困難な HepG 2 細胞は誘導の評価系として不適であるかもしれない。しかし、目的遺伝子の mRNA 発現量を高感度かつ定量的に検出可能な RT-competitive PCR 法を用いたところ、細胞内在性および薬物誘導性の CYPs mRNA 発現量を極めて高感度かつ再現性よく定量できた。特に、CYP 3 A 4 mRNA の常在発現を初めて定量し、RFP 添加による CYP 3 A 4 mRNA の誘導を捕らえることができた。さらに、HepG 2 細胞において RFP により他の CYP 分子種 (CYP 2 C 9 および CYP 1 A 2) が誘導され、分子種間で誘導の時間経緯が異なることを明らかにした。また、ヒト肝臓試料を用いた検討で CYP 3 A 4 mRNA 発現量と代謝活性との間に良好な相関が認められたことから、少なくとも CYP 3 A 4 に関しては mRNA レベルでの誘導が実際の活性誘導を反映するものと考えられる。

HepG 2 細胞を用いた他の誘導評価法として、Ogg らが構築し報告したレポータージーンアッセイがある。この方法は多数の被験化合物の誘導のスクリーニングに適用可能であるが、細胞内在性の mRNA を検出しておらず、転写活性のみを測定する手法である。酵素蛋白の発現には成熟 mRNA の全体量が反映されるので、申請者が用いた RT-competitive PCR 法は適していると思われる。加えて、細胞内在性の CYP mRNA 発現を測定できることは CYP の発現調節機構の解明にも有用であると考えられる。

以上、薬物代謝に最も寄与率の高い CYP 3 A 4 を中心に、CYP の mRNA 発現および誘導の評価に関する研究を行い、ヒト肝癌由来 HepG 2 細胞株において、RT-competitive PCR を用いることにより CYP 各分子種、特に CYP 3 A 4、CYP 2 C 9 および CYP 1 A 2 の mRNA 発現誘導の評価が可能となった。また申請者は、臨床における薬物相互作用予測の観点から、ヒト *in vivo* 薬物代謝酵素活性を評価する手段として、末梢血リンパ球に着目して検討を行ったが、CYP 3 AmRNA 発現は、RFP により誘導されないことが、*in vivo* および *in vitro* の実験系から明らかとなった。今後、ヒト肝 CYP 3 A 4 活性を簡便かつ低侵襲的に評価できるような代替組織や測定法を探索する必要がある。

論文審査の結果の要旨

ヒト薬物代謝酵素 CYP 誘導の評価は阻害の評価よりも困難とされている。これは、内在性 CYP が誘導される培養細胞系がほとんど知られていないこと、またヒトで観察される誘導が動物種によっては全く認められないことによる。本研究は、ヒト薬物代謝酵素の発現および誘導の評価に関するもので、薬物代謝に最も寄与率の高い CYP 3 A 4 の薬物による誘導を、mRNA レベルで評価できる *in vitro* 実験系を確立したもので、臨床的にも極めて重要なものである。すなわち、肝実質細胞の特性を良く維持しているとされるヒト肝癌由来 HepG 2 細胞株に着目し、数種の CYP 分子種が mRNA レベルで誘導されることを見出した。一方、ヒト肝臓試料を用いた検討で、CYP 3 A 4 mRNA 発現量と代謝活性との極めて高い相関を実証し、CYP 3 A 4 に関しては mRNA レベルでの誘導が薬物代謝能を反映することを証明した。本系を応用することにより、医薬品候補物質の CYP 誘導を定量的に評価でき、薬物相互作用の予測、医薬品開発の促進に有用な情報を提供することができる。また、臨床における薬物相互作用予測の観点から、ヒト *in vivo* 薬物代謝酵素誘導を評価する手段として、末梢血リンパ球を対象に検討した。CYP 3 A mRNA の誘導は *in vivo* および *in vitro* の何れにおいてもみられなかったが、CYP 1 B 1 mRNA 発現の著しい増加が *in vitro* 全血培養系で認められ、リンパ球での mRNA 発現誘導は分子種間で異なることを証明した。

以上、本研究は、医薬品適正使用を科学的に支持する臨床薬学的な研究を展開し、ヒト肝薬物代謝酵素の誘導を評価する系を確立したもので、博士 (薬学) の学位を授与するに相応しいものとする。