

cytochrome P450 など異物代謝酵素遺伝子の多形解析と毒性評価 2

分担研究者 藤田 正一 北海道大学大学院獣医学研究科 教授

研究要旨

シトクロム P450 (P450、CYP) は広範な生物種に存在し、生理活性物質の生合成や、医薬品・環境汚染物質などの代謝排泄に関与する、生体のホメオスタシス維持の為に重要な酵素である。CYP の発現調節機構はさまざまであるが、年齢、臓器によって CYP 分子種の発現パターンが異なっていることが報告されている。多くの CYP 分子種は、ステロイドホルモンやエイコサノイド、サイトカインなどによる発現制御を受けている。従って、これらの生理活性物質が大きく変動する妊娠期や性成熟は、CYP 活性を左右する大きな要因となっている。

そこで、CYP などの薬物代謝酵素を中心に、母体、胎盤、胎児の薬物代謝の差に関する最近の知見について文献調査を行った。母親および胎児・新生児の外来異物の代謝能に関し、胎児・新生児肝臓および胎盤における CYP や、抱合酵素などの Phase II 酵素の発現は、一部のステロイドホルモン代謝酵素を除くと成人に比べて低い為、母体肝臓における代謝能が薬物・環境汚染物質のクリアランスを決定していることが示唆される。妊娠期には、一部 CYP2D などの P450 分子種に関して、母体肝臓で活性が上昇している可能性も報告されている。しかし、多くの環境化学物質の代謝に関与する CYP、抱合酵素の発現、誘導は妊娠時の母体肝臓では抑制されることが分かった。

さらに、得られた知見を元に、実際に妊娠ラットを用いて母体肝臓における各 CYP 分子種の発現レベルや、aniline、propranolol、ethanol など薬物あるいは外来異物の代謝活性について測定した。CYP2D サブファミリーに関しては妊娠期に活性が増加するが、その他の CYP 分子種、CYP2B、CYP2E、CYP2C、CYP1A2 に関しては、蛋白発現量あるいは薬物代謝活性が、妊娠期に顕著に減少することが明らかとなった。

また、一方で、CYP 遺伝多型による代謝能の違いは薬物や環境化学物質の薬効・毒性を決定する重要なファクターとなっている。P450 には様々な分子種が存在するが、CYP の遺伝多形によって、薬物を中心とした外来異物のクリアランス、毒性発現が異なることが報告されている。また、そこで、P450 及びその制御機構に存在する遺伝多形について、新規 SNPs 解析方法の開発を試みた。本研究では、異物代謝酵素群及びその調節因子の遺伝的多形を一度に解析するために、新規マイクロアレイを作成した。

【研究協力者】

数坂 昭夫

(北海道大学大学院獣医学研究科助教授)

石塚真由美

(北海道大学大学院獣医学研究科助手)

ドホルモンやビタミン、エイコサノイドなどの生理活性物質の生合成・代謝を行うと同時に、医薬品や環境汚染物質など、多くの外来異物代謝も担っている一酸素添加酵素である。CYP には様々な分子種が存在し、哺乳類では数百に及ぶ分子種が報告されている。

CYP は外来異物の代謝に対して働く重要な薬物代謝酵素群であるが、同時に生理活性物質の生合成や異化も行うため、多くの CYP 分子種は、ステロイドホルモンやエイコサノイド、サイトカ

A. 研究目的

Cytochrome P450(P450、CYP)は細菌、植物から哺乳類まで多くの生物種に存在し、ステロイ

インなどによる発現制御を受けている。従って、これらの生理活性物質が大きく変動する妊娠期や性成熟は、CYP 活性を左右する大きな要因となっている。実際、ラットを用いた実験から、妊娠中は、母体側の CYP1A サブファミリーやグルクロン酸抱合酵素の誘導能や活性が減少するとの報告もあり、この時期に曝露され、生体に取り込まれた環境化学物質は通常とは異なる速度で代謝・排泄過程を経ることも考えられる。妊娠期の環境化学物質や薬物への曝露は、胎児に不可逆的な影響を与える可能性も考えられる。そこで、特に CYP を中心に、母体、胎盤、胎児の薬物代謝の差に関する最近の知見について文献調査を行った。

また、得られた知見を元に、母体肝臓における CYP 発現量や、薬物代謝活性の変動について、妊娠ラットをモデルとして研究を行った。

一方で、CYP 遺伝多型による代謝能の違いは薬物や環境化学物質の薬効・毒性を決定する重要なファクターとなっている。例えば、CYP2D6 はヒトにおいて、肝臓における総 CYP 発現量の 2-10% を占めているに過ぎないが、ヒト臨床に用いられる薬物の 3 割以上に関与する。同時に、debrisoquine や bunitrolol、bufuralol、propranolol などの薬物代謝活性は日本人や中国人において白人よりも低く、その低活性の原因が遺伝的多形（主に CYP2D6*10）に起因することも報告されている。また、P450 は薬物だけではなく、喫煙物質や食物由来の外来異物も代謝するため、CYP1A1 遺伝多形と肺癌、CYP1B1 遺伝多形と大腸癌発生率との関係も報告されている。そこで、P450 及びその制御機構に存在する遺伝多形について、新規 SNPs 解析方法の開発を試みた。

B. 研究方法

1. 母と子の薬物代謝の差

ヒトにおける母と子の薬物代謝、特に、母体肝臓、胎児肝臓、胎盤に発現する CYP を中心に、その発現レベルやパターンの違いについて文献を調べた。

2. 妊娠ラットの母体肝臓における薬物代謝能の変動

妊娠ラットをモデルとして、妊娠期に CYP 各分子種の発現や薬物代謝活性がどのように変動するのかを調べた。妊娠 0 日目、10 日目、11 日目、15 日目、18 日目、20 日目の Wistar ラットについて、肝臓を採取し、ミクロソームにおける CYP 発現や薬物代謝活性を測定した。

薬物代謝活性の基質には、実際にヒト臨床に用いられる薬剤も含め、propranolol R 体および S 体、imipramine、amitriptyline、p-nitrophenol、aniline、ethanol を用いた。Propranolol、imipramine、amitriptyline については、それぞれ低基質（各薬剤 5 μ M）および高基質濃度（propranolol 1000 μ M、imipramine 700 μ M、amitriptyline 100 μ M）において反応を行い、HPLC-UV によって代謝物の分析を行った。p-nitrophenol、aniline、ethanol はそれぞれ 100 μ M、2mM、50mM の基質濃度で反応を行い、吸光度計にて代謝活性の測定を行った。

妊娠時のラット肝臓に発現する CYP 各分子種発現量の変動は CYP2B1、CYP2B2、CYP2E1、CYP2C12 に特異的な各抗体（ウサギ血清）を用い、Western blotting によって解析した。

3. 薬物代謝酵素の遺伝的多形解析方法の新規開発

薬物代謝酵素に存在する遺伝的多形を簡便に調べる為に、マイクロアレイを用いた方法の開発を試みた。マイクロアレイ法ではサーマルサイクラー以外の特殊な機械を必要とせず、発色によって変異アレルを検出することができ、また、一度に多数の遺伝子について調べることができる。また、PCR 簡略化によって、PCR-RFLP 法よりも簡便に遺伝多形の検出を行うことができる可能性がある。

そこで、P450 などの薬物代謝酵素から、実際に function につながる変異であること、日本人に多型が多い変異であること、を考慮してアレルを選定し、マイクロアレイの作成を行った。

（倫理面への配慮）

動物を用いた全ての実験は北海道大学および同大学大学院獣医学研究科の定める実験ガイドラインに従って研究を実施した。動物実験計画の立案は、動物の導入から、飼育、実験操作、終了後の処置までを、科学的にはもとより動物福祉の観点に立って十分な検討を行い、動物実験の範囲を研究目的に必要な最小範囲にとどめるため実験操作の十分な検討を行った。また、遺伝子解析に関する本研究は、北海道大学大学院医学研究科倫理委員会および遺伝子解析審査小委員会に従って実施し、インフォームドコンセントは「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言に基づいて行った。

C. 研究成果

1. 母と子の薬物代謝の差

（1）ヒトCYPファミリー

CYPは巨大なスーパーファミリーを形成しており、アミノ酸の相同性によって、分子種名が決められている(1, 2)。40%以上相同性を持つものをファミリー、55%以上相同性を持つものをさらにサブファミリーとしている。これまでの研究において、ヒトではCYP1、CYP2、CYP3、CYP4、CYP5、CYP7、CYP8、CYP11、CYP17、CYP19、CYP21、CYP24、CYP26、CYP27、CYP39、CYP46、CYP51ファミリーがクローニングされ、それらの酵素学的性質が明らかにされている(表1)。CYPの中でも、CYP1、CYP2、CYP3、CYP4ファミリーは生理活性物質以外にも、様々な外来異物の代謝に関与することが知られており、ダイオキシン類や多環芳香族、PCB、農薬などを代謝する。外来異物代謝CYP分子種の調節因子として、AhR (aryl hydrocarbon receptor) や PXR (pregnane X receptor; NR1I2)、CAR (constitutive androstane receptor; NR1I3)、PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) が知られているが(3)、これらの受容体群は、ダイオキシン類やPCB、フタル酸エステルなどのリガンド受容体

にもなっている。多くの環境汚染物質はこれら受容体群を活性化し、CYP各分子種の発現量に影響を与える。最近では、CYP2C9がPXRで転写制御されていることも報告された(4, 5)。また、外来異物だけではなく、ステロイドホルモンであるprogesteroneやandrogensがCARを抑制し、また反対にestrogensはCARを活性化することが明らかとなった(6)。

（2）成人肝臓、胎盤、胎児肝臓に発現するCYP

これまでの報告で、ヒト肝臓および胎盤のCYP分子種の発現パターンは異なることがわかっている。最近、Nishimuraらによって、ヒト成人肝臓、胎児肝臓、胎盤に発現する30種のCYP分子種(CYP1A1、1A2、1B1、2A6、2A7、2B6、2C8、2C9、2C18、2C19、2D6、2E1、2J2、3A4、3A5、3A7、4A11、4F2、4F3、5A1、7B1、8A1、8B1、17、26A1、27、27B1、39A1、46、51)の発現パターンが報告された(7)。

図1にそれらの発現量を補正したグラフを示す。成人ヒト肝臓では、CYP2A6やCYP2E1 mRNAの発現量が多い。一方、胎児では、CYP2E1のほか、CYP4A11、CYP3A7、CYP8B1やCYP51の発現が比較的多い。以下に胎児肝臓に発現する各CYP isoformの特性について述べる。

CYP2E1は、acetaminophen、halothane、chlorzoxazone、四塩化炭素などを基質とし、ethanolやtolueneなどアルコールや有機溶剤によって誘導を受ける。CYP2E1は妊娠90日前の胎児肝臓ではほとんど発現していない(8)。

CYP4ファミリーは、脂肪酸やarachidonic acid、prostaglandin Aなどエイコサノイドの水酸化を行っている(9)。ヒトCYP4A11はBellらによってクローニングされ(10)、その後、脂肪酸の ω 水酸化を行うことが明らかとなった(11) CYP4ファミリーの転写調節因子として、PPAR α が報告されており、そのリガンドとして、脂肪酸、leukotriene B4や8(S)-hydroxyeicosatetraenoic acidが知られている(12, 13, 14)。

また、ヒトの CYP3A サブファミリーは CYP3A4、CYP3A43、CYP3A5、CYP3A7 が同定されている。特に adult では CYP3A4 の肝臓における発現は多く、薬物代謝の 50% に関与すると考えられている (15)。CYP3A4 の基質となるのは (16)、ステロイドホルモンである testosterone、progesterone、androstenediol、DHEA や胆汁酸である。また、医薬品では quinidine、nifedipine、diltiazem、lidocaine、lovastatin、erythromycin、cyclosporin、triazolam、midazolam などを代謝することが報告されている。ヒト CYP3A サブファミリーは rifampicin、dexamethasone、nifedipine、phenobarbital などで誘導を受けることがわかっている。また、CYP3A の転写が PXR や CAR で制御されていることが報告された (17, 18, 19, 20)。CYP3A4 には性差が存在し、女性の方が発現量が高い。しかし、CYP3A4 の転写を制御する PXR の発現に性差は存在せず、P 糖タンパクの発現にも性差は認められなかった (21)。

胎児肝臓では、成人肝臓と異なり、CYP3A7 が特異的に発現している。分娩直前まで CYP3A7 の発現は継続し、生後は CYP3A4 の発現量が増加することがわかっている。図に胎児期から新生児期における CYP 分子種の発現パターンを示す (図 2)。また、CYP3A7 の胎児期における生理的な機能は DHEA などステロイドホルモンの調節であると考えられている (図 3) (22)。最近では、Chen らによって、CYP3A7 の基質の一つがレチノイン酸であることが報告され、CYP3A7 がステロイドホルモンだけでなく、CYP26 とともに、発達期のレチノイン酸のホメオスタシスにも関与していることを明らかにした (23)。

CYP8B1 は Gafvels ら (1999) によってヒトおよびマウスよりクローニングされた (24)。CYP8B1 プロモーターは hepatocyte nuclear factor-4-alpha (HNF4A) によって活性化される (25)。CYP8B1 は sterol の 12 α 位水酸化を行っており、水溶性の変化によって胆汁酸の生体内

動態と濃度を調節していることが報告されている (26)。

CYP51 は微生物、植物や動物に広く分布する CYP 分子種であり、コレステロールの生合成の key step である sterol の 14 α 位脱メチル化反応を行っている (27)。

従って、胎児期の肝臓に主に発現している CYP は、ステロイドホルモン、コレステロール、脂肪酸、胆汁酸、レチノイン酸などの生理活性物質を水酸化する分子種である。成人肝臓の CYP 発現レベルに対する胎児肝臓 CYP 発現量の比からも、胎児肝臓では、CYP3A7、CYP11A、CYP19 などが、成人の肝臓に比べて特異的に発現していることが明らかである (図 4)。すなわち、胎児肝臓では、CYP は主に生理活性物質の調節に寄与していることが考えられる。

一方、実験動物では、胎児肝臓を成体に移植し、胎盤通過効果を見逃して胎児の肝臓における CYP 誘導能を調べた報告がある。胎仔肝臓を adult ラットに移植し、 β -naphthoflavone、phenobarbital、dexamethasone を投与した実験では、胎仔の肝臓で CYP1A、CYP2B そして CYP3A が誘導されることが明らかとなった (28)。1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-p-dioxin を分娩後の母親に投与したラットの実験では、1,2,3,4-TCDD が乳汁によって新生仔に移行し、新生仔の肝臓で CYP1A1 依存の ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) 活性が上昇し、CYP1A2 依存の methoxyresorufin-o-demethylase (MROD) もわずかではあるが上昇することが分かった (29)。また、dexamethasone や pregnenolone-16 α -carbonitrile (PCN) を妊娠ラットに曝露した実験では、胎仔肝臓において CYP3A1 が誘導されることが報告されている (30)。また、妊娠 16 週から 24 週のヒト胎児肝臓では CYP2E1 が発現しており、妊娠 19、23、25 週齢の胎児の初代肝培養細胞を用いた実験でも、ethanol や clofibrate によって、非曝露時に比べて CYP2E1 の発現量が上昇することが報告

されている (31)。CYP2B サブファミリーはニコチンを代謝するため、CYP2B の代表的な誘導剤である Phenobarbital 投与だけではなく、smoking によっても発現誘導を受ける。最近、母親の smoking によって、ラット新生仔肝臓において CYP2B 発現の上昇が、報告された (32)。以上の報告からも、胎児肝臓においても、成人肝臓と同様に、薬物代謝酵素の発現の誘導が起こることがわかった。

一方、胎児期に発現する主要な P450 isoform の CYP3A サブファミリーはコカインを代謝する。成人や胎児肝臓ミクロソームを用いた実験では、コカイン N 脱メチル化 (CYP3A 依存) は胎児肝ミクロソームのほうが低い Km を示し、P450 あたりのコカインのクリアランスは胎児肝臓のほうが早いことが分かった (33)。しかし、実際には、肝臓に発現する P450 量の差から、コカイン代謝活性は、胎児肝臓よりも成人肝臓のほうが高い。前述した CYP2B サブファミリーの smoking による誘導に関しても、新生仔肝臓で誘導された CYP2B 発現レベルは、adult ラット非誘導時の 1/10 程度に過ぎない。また、CYP1A2 は adult の肝臓において恒常的に発現しているが、新生仔ラットでは肝臓の CYP1A2 依存 MROD 活性は adult ラットの 1/10 以下である。羊などのモデル動物を用いて胎仔の肝臓における薬物代謝能を測定した実験では、胎仔肝臓における薬物基質 (propranolol など) の代謝体の濃度は adult に比べると低いことが報告されている (34, 35)。

CYP による phase I の反応の後、多くの基質は phase II 酵素による修飾を受ける。Phase II 反応を担う主要酵素のグルクロン酸抱合酵素 (UGT) には、CYP と同じく、多くの分子種が存在する (36)。環境ホルモンである xenoestrogen などを抱合する UGT2B はラットでは生後 21 日目に adult とほぼ同程度の活性まで上昇するが、生後 3 日目の新生児期のラットでは、肝臓における UGT2B1 活性は、adult の肝臓に比べて 40-80% に減少していることが報告されている (37)。

胎盤では、CYP11 や CYP19 の発現が認めら

るが、CYP 発現量は胎児の肝臓に比べてさらに低い。さらに、dexamethasone や PCN の妊娠ラットへの投与では、胎盤における CYP3A1 発現は低く、この CYP に関しては胎盤では誘導能がほとんどないことが明らかとなった。また smoking による CYP2B サブファミリーの誘導も、ラットおよびヒトの胎盤においては認められなかった。

以上の知見から、外来異物を代謝する CYP 分子種の発現レベルは、成人肝臓>胎児肝臓>胎盤の順で、妊娠時に、外来異物のクリアランスを決定するのは、母体肝臓であることが考えられる。

(3) 妊娠期における母体肝臓の薬物代謝酵素

これまでの知見から、妊娠時の外来異物のクリアランスに寄与するのは、主に母体肝臓であることが示唆された。しかし、妊娠時には、母体肝臓における CYP 分子種は通常の成人の CYP 発現とは異なるパターンを示すことも報告されている。CYP1 ファミリーの一つ CYP1B1 は extra hepatic な CYP 分子種で、通常、肝臓よりも血液中の発現量のほうが 20% 程度多い (38)。女性の血液中での CYP1B1 発現量は男性に比べて有意に高いことも報告されているが (39)、妊娠期間に血液中の CYP1B1 mRNA 発現量は変動しないことが報告されている (40)。しかし、同じ CYP1 ファミリーに関し、ラットを用いた実験から、妊娠中は、非妊娠時に比べて、母体側の CYP1A サブファミリー誘導能や活性が減少するとの報告がある (41)。また、喫煙による CYP2B サブファミリーの肝臓での誘導は、非妊娠時と違って妊娠時にはほとんど起こらないことがラットの実験から報告されている。

CYP による代謝の後、多くの薬物は phase II 酵素による抱合を受け、水溶性を増して排泄されやすくなる。しかし、妊娠中に曝露され、生体に取り込まれた環境化学物質は、通常とは異なる速度で代謝・排泄過程を経ることが考えられる。グルクロン酸抱合酵素分子種のひとつで、bisphenol A や nonylphenol、DES などの xenoestrogen の代謝に関わる UGT2B1 の活性は、妊娠期には

非妊娠児期の10-20%減少することがラットを用いた実験から報告された。UGT2B以外にも、妊娠期には、UGT1ファミリーの代謝活性も減少することが報告されている(42)。UGT1A1、UGT1A5、UGT1A6、UGT1A7は、妊娠期において、mRNA発現レベルは抑制されていないが、蛋白発現量が非妊娠時の30%以下に減少していた。

また、妊娠期における高血糖因子は先天性異常を引き起こす要因となることが報告されているが、その原因としてoxidative stressの増加が報告されている(43)。4-hydroxy-2(E)-nonenal (4HNE)は、リノール酸やアラキドン酸などの ω 6系高度不飽和脂肪酸が酸化ストレスをうけることでnon-enzymaticに生成されるアルデヒドであり、activeで毒性が強い(44)。4HNEはphase IIのグルタチオン抱合酵素のひとつGSTA4-4によって抱合を受け、解毒されることが報告されている(45)。従って、抱合酵素GSTは妊娠期における生体の抗酸化機構に重要な因子のひとつである。実際、MnSOD (manganese superoxide dismutase)の多型とともに、GST M1が欠損する遺伝多型 null typeでは、子宮においてoxidative stressの指標となる8-OHdGの生成量が多いことが報告されている(46)。

妊娠時に1-3%の合併が報告されている高血糖について、ラットを用いた実験が行われているが、高血糖妊娠ラットの膵臓ではCYP2E1依存の代謝活性が上昇するとともに、母体肝臓のGSTの発現および代謝活性が低下し、脂質の過酸化が増加することが報告されている(47)。一方、糖尿病患者の胎盤に発現するCYP1A依存EROD活性は非糖尿病患者と差はなかったが、胎盤GST依存のCDNB抱合活性は、糖尿病患者では対照群に比べると有意に増加していることが報告された(48)。しかし、顕性糖尿病では、胎盤においてGST活性が顕著に減少することも報告された(49)。

従って、一部CYP2Dサブファミリーについて、母体肝臓での発現の上昇の可能性も報告されてい

るが(50)、妊娠期において、多くのCYP分子種やUGT分子種の発現レベルが減少し、それらの酵素群の誘導能の低下することから、この時期の環境化学物質や薬物への曝露は、薬剤クリアランスの変化から、体外への排泄が遅れ、胎児に不可逆的な影響を与える可能性も考えられる。

そこで、次に、実験動物ラットを用いて、実際にヒトの臨床に用いられる薬物や、アルコールを基質として、妊娠期中の母体肝臓における薬物代謝能の変化を経時的に調べた。

2. 妊娠ラットの母体肝臓における薬物代謝能の変動

妊娠期におけるラットの母体肝臓のCYP発現量は非妊娠期に比べて有意に減少した(対照群の約70%)。しかし、CYP、特にCYP1ファミリーに電子伝達を行うcytochrome b5の発現量に変化は見られなかった(図5)。

表に各薬剤(propranolol R体およびS体、imipramine、amitriptyline、aniline、p-nitrophenol、ethanol)を基質としたときの、妊娠期のラット肝臓ミクロソームにおける薬物代謝活性の変動を示す(表2)。

propranololは β 1受容体を遮断する作用があるため、臨床において抗高血圧薬、特に抗不整脈薬として用いられている。propranolol R体について、妊娠前期(妊娠15日齢まで)に、5位水酸化活性の上昇と、N脱イソプロピル化活性の減少が認められた(図7)。また、三環系抗鬱剤の一つであるimipramineをモデル薬物として妊娠ラット肝ミクロソームで代謝させたところ、低基質濃度(5 μ M)では代謝活性に大きな変動は見られなかったが、高基質濃度(700 μ M)ではN脱メチル化活性の顕著な低下が妊娠時期に認められた。amitriptylineは低基質、高基質濃度のいずれも、代謝活性に関して妊娠による影響は認められなかった。

aniline、p-nitrophenol、ethanolの水酸化活性は妊娠期には非妊娠期の50%まで減少した。各薬剤の代謝活性の減少は基質によって異なるが、

特に CYP2E1 依存の代謝活性である aniline 水酸化は全妊娠期を通して低活性であった（図 8）。CYP2C12、CYP2B1、CYP2B2、CYP2E1 に特異的な各抗体を用いて行った Western blotting の結果から、いずれの分子種も妊娠期では非妊娠期に比べて蛋白発現量が減少することが分かった（図 6）。

3. 薬物代謝酵素の遺伝的多形解析方法の新規開発

P450 は CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2C19、CYP2D6、その他の薬物代謝酵素や調節因子として、GSTM1、GSTP1、NAT2、AhR、PPAR の 11 遺伝子、の 32 アレルをリストアップした（表 3）。

変異場所の増幅に PCR を用いるため、multiplex PCR による条件設定を行ったところ、GST null や CYP2D6 deletion に関しては遺伝多型の検出が困難だった為、これらのアレルを除いた遺伝子について wild、変異アレルの DNA を合成してスライドガラスにスポットティングし、マイクロアレイを作成した。Primer は PCR 産物が数 100bp 以内になるように設計し、multiplex PCR を 3 回に分けて行った。得られた PCR 産物は、混合してスライドガラス上のオリゴ DNA にハイブリダイズし、ペルオキシダーゼによって発色させ、アレルの判定を行った。

D. 考 察

胎児期の肝臓に主に発現している CYP は、CYP3A7、CYP11A、CYP19 など、ステロイド、コレステロール、脂肪酸、胆汁酸、レチノイン酸などの生理活性物質を水酸化する分子種であることが明らかとなった。これらの CYP 分子種では、CYP3A を除くと基質特異性が狭く、外来異物の排泄には余り関与していない。従って、胎児肝臓では、発現するほとんどの CYP は生理活性物質の調節に寄与していることが考えられる。従って、母体肝臓における代謝能が、胎児期の薬物・環境汚染物質のクリアランスを決定している

ことが示唆される。しかし、妊娠時期には、母体側の肝臓に発現する CYP やグルクロン酸抱合酵素の誘導能や活性が減少するため、外来異物の代謝・排泄能が通常よりも低いことが考えられた。

我々の研究においても、モデルや薬物として用いた propranolol の代謝活性に関して、妊娠期に 5 位水酸化活性の上昇が認められたものの、N 脱イソプロピル化活性は減少していた。ラットおよびヒトにおいて、propranolol 5 位水酸化は CYP2D6 あるいは CYP2D2 の CYP2D サブファミリー、propranolol 脱イソプロピル化活性は CYP1A2 が行っていることがわかっている。これまでの報告でヒト妊娠期では CYP2D6 発現上昇を示唆する報告があるが、実際、ラットの妊娠期においても CYP2D サブファミリー依存の代謝活性は増加していた。しかし、総 CYP 量や、CYP2D 以外の CYP2B、CYP2C、CYP2E、CYP1A 分子種に関しては、蛋白発現量あるいは代謝活性は妊娠期に顕著に減少しており、この時期に薬剤のクリアランスが通常と異なること、代謝活性が抑制されていることが分かる。

一方、ヒト CYP の SNPs など遺伝多型解析において、multiplex PCR 法を用いたマイクロアレイ解析法は、従来の PCR-RFLP 法よりも簡便に多くの変異アレルの遺伝多型検出を行うことができる可能性がある。しかし、マイクロアレイ法による判定では、PCR の正確性やハイブリダイゼーション上の都合から、極端に大きな PCR 産物（数 10kbp など）を用いた実験は難しい。特に、CYP2D6 deletion、GST null などの deletion アレルは、数イントロン、エクソンにまたがる繰り返し配列が原因で起こっていると考えられる為、各アレルに特異的な PCR 産物の作成が難しかった。

E. 結 論

母親および胎児・新生児の外来異物の代謝能に関し、胎児・新生児肝臓および胎盤における CYP、抱合酵素など Phase II 酵素の発現は、一部のステロイドホルモン代謝酵素を除くと成人に比べて低

い為、母体肝臓における代謝能が薬物・環境汚染物質のクリアランスを決定していることが示唆される。しかし、一部 CYP2D などの P450 分子種に関しては、母体肝臓で活性が上昇している可能性があるが、多くの環境化学物質の代謝に関与する CYP、抱合酵素の発現、誘導は妊娠時の母体肝臓では抑制される。

一方、ヒト CYP の SNPs 解析において、multiplex PCR 法を用いたマイクロアレイ解析法は、従来の PCR-RFLP 法よりも簡便に遺伝多形の検出を行うことができた。

F. 参考文献

1. <http://drnelson.utmem.edu/cytochromep450.html>
2. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 1996 Feb;6(1):1-42.
3. Honkakoski P, Negishi M. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J*. 2000 Apr 15;347(Pt 2):321-37.
4. Gerbal-Chaloin S, Daujat M, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, Vilarem MJ, Maurel P. Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem*. 2002 Jan 4;277(1):209-17. Epub 2001 Oct 25.
5. Synold TW, Dussault I, Forman BM. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med*. 2001 May;7(5):584-90.
6. Kawamoto T, Kakizaki S, Yoshinari K, Negishi M. Estrogen activation of the nuclear orphan receptor CAR (constitutive active receptor) in induction of the mouse Cyp2b10 gene. *Mol Endocrinol*. 2000 Nov;14(11):1897-905.
7. Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S, Satoh T. Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi*. 2003 May;123(5):369-75.
8. Johnsrud EK, Koukouritaki SB, Divakaran K, Brunengraber LL, Hines RN, McCarver DG. Human hepatic CYP2E1 expression during development. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Oct;307(1):402-7.
9. Roman, L. J., Palmer, C. N. A., Clark, J. E., Muerhoff, A. S., Griffin, K. J., Johnson, E. F. and Masters, B. S. S. (1993) Expression of rabbit cytochromes P4504A which catalyze the w-hydroxylation of arachidonic acid, fatty acids, and prostaglandins. *Arch. Biochem. Biophys.* 307, 57-65
10. Bell, D. R.; Plant, N. J.; Rider, C. G.; Na, L.; Brown, S.; Ateitalla, I.; Acharya, S. K.; Davies, M. H.; Elias, E.; Jenkins, N. A.; Gilbert, D. J.; Copeland, N. G.; Elcombe, C. R. : Species-specific induction of cytochrome P-450 4A RNAs: PCR cloning of partial guinea-pig, human and mouse CYP4A cDNAs. *Biochem. J.* 294: 173-180, 1993.
11. Kawashima, H.; Kusunose, E.; Kikuta, Y.; Kinoshita, H.; Tanaka, S.; Yamamoto, S.; Kishimoto, T.; Kusunose, M. :

- Purification and cDNA cloning of human liver CYP4A fatty acid omega-hydroxylase. *J. Biochem.* 116: 74-80, 1994.
12. Göttlicher, M, Widmark, E., Li, Q. and Gustafsson, J.-Å. (1992) Fatty acids activate a chimera of the clofibrilic acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 4653-4657
 13. Devchand, P. R., Keller, H., Peters, J. M., Vazquez, M., Gonzalez, F. J. and Wahli, W. (1996) The PPAR α -leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature (London)* 384, 39-43
 14. Yu, K., Bayona, W., Kallen, C. B., Harding, H. P., Ravera, C. P., McMahon, G., Brown, M. and Lazar, M. A. (1995) Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J. Biol. Chem.* 270, 23975-23983
 15. Bertz RJ, Granneman GR. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet.* 1997 Mar;32(3):210-58.
 16. Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999 39:1-17.
 17. Bertilsson G, Heidrich J, Svensson K, Asman M, Jendeberg L, Sydow-Backman M, Ohlsson R, Postlind H, Blomquist P, Berkenstam A. Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 13;95(21):12208-13.
 18. Blumberg B, Sabbagh W Jr, Juguilon H, Bolado J Jr, van Meter CM, Ong ES, Evans RM. SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev.* 1998 Oct 15;12(20):3195-205.
 19. Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterstrom RH, Perlmann T, Lehmann JM. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell.* 1998 Jan 9;92(1):73-82.
 20. Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, Maurel P, Vilarem MJ. The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2003 Feb 17;1619(3):243-53.
 21. Wolbold R, Klein K, Burk O, Nussler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology.* 2003 Oct;38(4):978-88
 22. Oesterheld JR. A review of developmental aspects of cytochrome P450. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 1998;8(3):161-74.
 23. Chen H, Fantel AG, Juchau MR. Catalysis of the 4-hydroxylation of retinoic acids by cyp3a7 in human fetal hepatic tissues. *Drug Metab Dispos.* 2000 Sep;28(9):1051-7.
 24. Gafvels, M.; Olin, M.; Chowdhary, B. P.; Raudsepp, T.; Andersson, U.; Persson, B.; Jansson, M.; Bjorkhem, I.; Eggertsen, G. : Structure and chromosomal assignment of the sterol

- 12-alpha-hydroxylase gene (CYP8B1) in human and mouse: eukaryotic cytochrome P-450 gene devoid of introns. *Genomics* 56: 184-196, 1999.
25. Zhang, M.; Chiang, J. Y. L. : Transcriptional regulation of the human sterol 12-alpha-hydroxylase gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4-alpha in mediating bile acid repression. *J. Biol. Chem.* 276: 41690-41699, 2001.
26. Pandak WM, Bohdan P, Franklund C, Mallonee DH, Eggertsen G, Bjorkhem I, Gil G, Vlahcevic ZR, Hylemon PB. Expression of sterol 12alpha-hydroxylase alters bile acid pool composition in primary rat hepatocytes and in vivo. *Gastroenterology.* 2001 Jun;120(7):1801-9.
27. Rozman, D.; Stromstedt, M.; Tsui, L.-C.; Scherer, S. W.; Waterman, M. R. : Structure and mapping of the human lanosterol 14-alpha-demethylase gene (CYP51) encoding the cytochrome P450 involved in cholesterol biosynthesis: comparison of exon/intron organization with other mammalian and fungal CYP genes. *Genomics* 38: 371-381, 1996.
28. Lupp A, Lau K, Trautmann AK, Krause T, Klinger W. Transplantation of fetal liver tissue suspension into the spleens of adult syngenic rats: inducibility of cytochrome P450 dependent monooxygenase functions by beta-naphthoflavone, phenobarbital and dexamethasone. *Exp Toxicol Pathol.* 1999 Jan;51(1):65-74.
29. Kono Y, Okada S, Tazawa Y, Kanzaki S, Mura T, Ueta E, Nanba E, Otsuka Y. Effect of lactational exposure to 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on cytochrome P-450 1A1 mRNA in the neonatal rat liver: quantitative analysis by the competitive RT-PCR method. *Pediatr Int.* 2001 Oct;43(5):458-64.
30. Ejiri N, Katayama K, Doi K. Induction of CYP3A1 by dexamethasone and pregnenolone-16alpha-carbonitrile in pregnant rat and fetal livers and placenta. *Exp Toxicol Pathol.* 2003 Mar;54(4):273-9.
31. Carpenter SP, Lasker JM, Raucy JL. Expression, induction, and catalytic activity of the ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) in human fetal liver and hepatocytes. *Mol Pharmacol.* 1996 Feb;49(2):260-8.
32. Czekaj P, Wiaderkiewicz A, Florek E, Wiaderkiewicz R. Expression of cytochrome CYP2B1/2 in nonpregnant, pregnant and fetal rats exposed to tobacco smoke. *Acta Biochim Pol.* 2000;47(4):1115-27.
33. Ladona MG, Gonzalez ML, Rane A, Peter RM, de la Torre R. Cocaine metabolism in human fetal and adult liver microsomes is related to cytochrome P450 3A expression. *Life Sci.* 2000 Dec 15;68(4):431-43.
34. Ring JA, Ghabrial H, Ching MS, Smallwood RA, Morgan DJ. Fetal hepatic drug elimination. *Pharmacol Ther.* 1999 Dec;84(3):429-45.
35. Ring JA, Ghabrial H, Ching MS, Shulkes A, Smallwood RA, Morgan DJ. Fetal hepatic propranolol metabolism. Studies in the isolated perfused fetal sheep liver. *Drug Metab Dispos.* 1995

- Feb;23(2):190-6.
36. Bock KW. Vertebrate UDP-glucuronosyltransferases: functional and evolutionary aspects. *Biochem Pharmacol.* 2003 Sep 1;66(5):691-6.
37. Matsumoto J, Yokota H, Yuasa A. Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environ Health Perspect.* 2002 Feb;110(2):193-6.
38. Finnstrom N, Thorn M, Loof L, Rane A. Independent patterns of cytochrome P450 gene expression in liver and blood in patients with suspected liver disease. *Eur J Clin Pharmacol.* 2001 Aug;57(5):403-9.
39. Finnstrom N, Ask B, Dahl ML, Gadd M, Rane A. Intra-individual variation and sex differences in gene expression of cytochromes P450 in circulating leukocytes. *Pharmacogenomics J.* 2002;2(2):111-6
40. Lind AB, Wadelius M, Darj E, Finnstrom N, Lundgren S, Rane A. Gene expression of cytochrome P450 1B1 and 2D6 in leukocytes in human pregnancy. *Pharmacol Toxicol.* 2003 Jun;92(6):295-9.
41. Khlood EB, Miyoshi H, Iwata H, Kazusaka A, Kon Y, Hadid AH, Moustafe EK, Ghonim MH, Fujita S. Effects of concurrent exposure to 3-methylcholanthrene and vitamin A on fetal development in rats. *Jpn J Vet Res.* 1999 Aug;47(1-2):13-23.
42. Luquita MG, Catania VA, Pozzi EJ, Veggi LM, Hoffman T, Pellegrino JM, Ikushiro Si, Emi Y, Iyanagi T, Vore M, Mottino AD. Molecular basis of perinatal changes in UDP-glucuronosyltransferase activity in maternal rat liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 Jul;298(1):49-56.
43. Zaken V, Kohen R, Ornoy A. Vitamin C and E improve rat embryonic antioxidant defense mechanism in diabetic culture medium. *Teratology* 2001; 64: 33-44.
44. Zarkovic N. 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol Aspects Med.* 2003 Aug-Oct;24(4-5):281-91.
45. Bruns CM, Hubatsch I, Ridderstrom M, Mannervik B, Tainer JA. Human glutathione transferase A4-4 crystal structures and mutagenesis reveal the basis of high catalytic efficiency with toxic lipid peroxidation products. *J Mol Biol.* 1999 May 7;288(3):427-39.
46. Glover DD, McRobie DJ, Tracy TS. Effects of gestational and overt diabetes on placental cytochromes P450 and glutathione S-transferase. *Prim. Care Update Ob Gyns.* 1998 Jul 1;5(4):189.
47. Raza H, John A. Glutathione metabolism and oxidative stress in neonatal rat tissues from streptozotocin-induced diabetic mothers. *Diabetes Metab Res Rev.* 2004 Jan-Feb;20(1):72-8.
48. McRobie DJ, Glover DD, Tracy TS. Effects of gestational and overt diabetes on human placental cytochromes P450 and glutathione S-transferase. *Drug Metab Dispos.* 1998 Apr;26(4):367-71.

49. Glover DD, McRobie DJ, Tracy TS. Effects of gestational and overt diabetes on placental cytochromes P450 and glutathione S-transferase. *Prim. Care Update Ob Gyns.* 1998 Jul 1;5(4):189.
50. Wadelius M, Darj E, Frenne G, Rane A. Induction of CYP2D6 in pregnancy. *Clin Pharmacol Ther.* 1997 Oct;62(4):400-7.
- 4) Ishizuka M, Yonemoto J, Zaha H, Tohyama C, Sone H. Perinatal exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters sex-dependent expression of hepatic CYP2C11. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003;17(5):278-85.
- 5) Hiroshi Hoshino, Shoichi Fujita, Yoko Goto, Takeomi Isono, Ishinazaka Tsuyoshi, Sakurai Yasunori. Organochlorine compound accumulation in Steller sea lion *Eumetopias jubatus* migrating along the coast of Hokkaido in northern Japan. *Jpn J Toxicol.* 2003;6(1):1-10

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Konomu Saito, Hyung-Sub Kim, Noriaki Sakai, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Polymorphism in diazepam metabolism in Wistar rat (in press)
- 2) Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short period exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone metabolism in testis of prepubertal rats. *Arch Toxicol.* 2003 Aug;77(8):446-51.
- 3) Sakamoto KQ, Nakai K, Aoto T, Yokoyama A, Ushikoshi R, Hirose H, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Cytochrome p450 induction and gonadal status alteration in common carp (*Cyprinus carpio*) associated with the discharge of dioxin contaminated effluent to the Hikiji River, Kanagawa Prefecture, Japan. *Chemosphere.* 2003 May;51(6):491-500.

2. 学会発表

1) 第135回日本獣医学会（平成15年春）

- ① Nakano et al. マウス肝におけるCYP1A2誘導に伴うウロポルフィリン生成の制御機構—鉄による効果—
- ② Saji et al. ウグイを用いた小樽、石狩、美国港周辺の環境汚染の評価
- ③ Ibrahim et al. Down-regulations of expressions of PPAR-alpha and AhR target genes by AhR and PPAR-alpha ligands, respectively

2) 第30回日本トキシコロジー学会

- ① Nakano et al. マウス肝におけるCYP1A2誘導に伴うウロポルフィリン生成の制御機構—鉄による効果—
- ② Sasaki et al. 抗菌剤フラゾリドンとその代謝物が肝薬物代謝酵素系に与える影響
- 3) 環境ホルモン学会 第6回研究発表会
- ① Joji Tsunada, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka and Shoichi Fujit. Transient neonatal exposure of brain to testosterone surge initiates amplification of testosterone production in astrocytes.

② Naosuke Saji, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Biomonitoring of the Harbor Seawater Environment in Hokkaido Coast with Induced Hepatic Cytochrome P450 of Minnow

4) Annual Meeting of Society of Environmental Toxicology and Chemistry in New Zealand

① Hiroshi Hoshino, Shoichi Fujita, Yoko Goto, Takeomi Isono, Tsuyoshi Ishinazaka, Vladimir N. Burkanov, Yasuhiro Sakurai. Organochlorine pollutions in Steller SeaLions Eumetopias Jubatus living in the far eastern waters

② Hyung-Sub Kim, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Short period exposure of di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone and arachidonic acid metabolisms in testis of prepubertal rats

5) バイオアッセイ研究会・環境毒性学会

① 佐治尚介、石塚真由美、数坂昭夫、藤田正一 ウグイを用いた小樽、石狩、美国港周辺の環境汚染の評価

② 星野広志、藤田正一、後藤陽子、磯野岳臣、石名坂豪、Vladimir N. Burkanov, 桜井泰憲. Organochlorine pollutions in Steller SeaLions Eumetopias Jubatus living in the far eastern waters (極東海域に棲息するトドにおける有機塩素系化合物汚染)

③ Hyung-Sub Kim, Mayumi Ishizuka, Akio Kazusaka, Shoichi Fujita. Short period exposure of di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone and arachidonic acid metabolisms in testis of prepubertal rats

表1 ヒトに発現する CYP 分子種

ファミリー	サブファミリー	機能や発現
CYP1	A	1 発現は少なく、肺など肝臓以外の組織にも分布。TCDD や多環芳香族で発現が誘導。
		2 肝臓で発現する P450 の 10%以上を占める。医薬品代謝の他、食物由来の MeIQ など代謝し活性化する。
	B	1 CYP1A と同じく AhR で発現を調節される。肝臓は発現が少ない。内因性基質としてはエストロゲンを代謝。
	A	6 肝臓に発現し、クマリンなどを代謝する。テストステロン 7 位水酸化。
		7
		13
		18
	B	6 テストステロンの 16 α 位、16 β 位を水酸化する。発現は肝 P450 の 2% 以下に過ぎないが、様々な外来異物で誘導を受ける。
		7
		8
C	9 遺伝的多形が存在する。	
	18	
	19	
CYP2	D	6 多くの薬物代謝に関わる。遺伝的多形が報告されている。肝臓における発現は P450 総量の 2%だが、薬物代謝の 30%以上に関与する。
		7
		8
	E	1 アルコールや絶食で誘導を受ける。内因性基質としてアセトンを代謝。
	F	1 肺より単離された。エトキシクマリン代謝。
	G	1 Olfactory に分布
		2
	J	2 心臓に主に局在し、アラキドン酸を代謝(エポキシ化)する。
	R	1
	S	1
	T	2
		3
	U	1
	W	1
CYP3	A	3
		4 ヒトの肝臓(成人)の 30-40%を占める主要な P450 分子種。
		5 CYP3A4 よりは発現量が少ないが、様々な薬物代謝に関わる。肝臓以外にも分布する。
		7 ヒト胎児肝臓の 30%を占める、胎児特異的な P450 分子種。成人の肝臓で検出される mRNA はわずか。DNA 配列では CYP3A4 と 90%の相同性を持つ。
		43
CYP4	A	11 ヒトの肝臓には少なく、肺や胎盤でクローニングされた。ロイコトリエンや脂肪酸を代謝する。
		20
	B	1

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書

		2	ロイコトリエン B4 の水酸化酵素。
		3	ロイコトリエン B4 の水酸化酵素。
		8	
		9	
		10	
		11	
	F	12	
		22	
		23	
		24	
		25	
		26	
		27	
	V	2	
	X	1	
	Z	1	
CYP5	A	1	トロンボキサン合成酵素。
CYP7	A	1	コレステロール 7 α 位水酸化酵素。胆汁酸合成の第一ステップを担う。CPF (cholesterol 7 α -hydroxylase promoter factor) で発現調節される。
	B	1	オキシステロール 7 α 位水酸化酵素。
CYP8	A	1	プロスタサイクリン合成酵素（プロスタグランジン H2 \rightarrow I2）。
	B	1	ステロール 12 α 位水酸化酵素。
CYP11	A	1	コレステロール側差切断を行う（コレステロールからステロイドホルモン合成経路に入る第 1 段階）。別名 P450 _{sc} 。
	B	1	ステロイド 11 β 位水酸化酵素。
	B	2	ステロイド 11 β 位水酸化酵素。アルドステロンの生成を行う。
CYP17			ステロイドの 17 位水酸化
CYP19			アンドロゲンからエストロゲン生成（テストステロン \rightarrow エストラジオール、アンドロステンジオン \rightarrow エストロン）
CYP21	A	1	
	A	2	
CYP24			ビタミン D24 位水酸化酵素。
CYP26	A	1	レチノイン酸を代謝して不活化する。最初 P450RAI と名付けられる。
	B	1	
CYP27	A	1	脳髄黄色腫症(Cerebrotendinous xanthomatosis; CTX) の原因遺伝子。
	B	1	
	C	1	
CYP39			
CYP46			コレステロール 24 位水酸化酵素。
CYP51			ラノステロール 14 α 位脱メチル化酵素。プロモーターから推測すると Housekeeping 遺伝子。

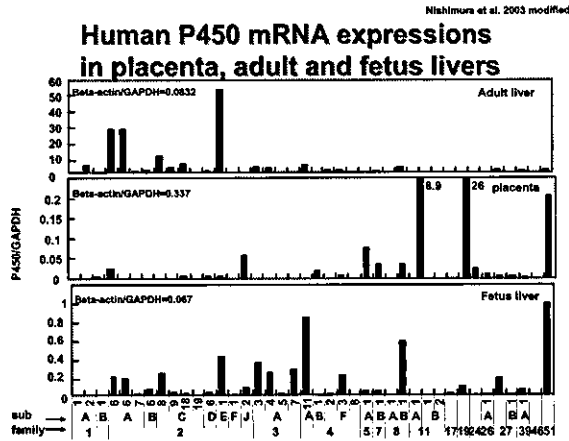


図1：ヒト肝臓、胎児肝臓および胎盤に発現する CYP mRNA パターン (Nishimura ら 2003 の文献より)。Real-time RT-PCR によって得られた各 CYP 発現レベルを GAPDH で補正したもの。

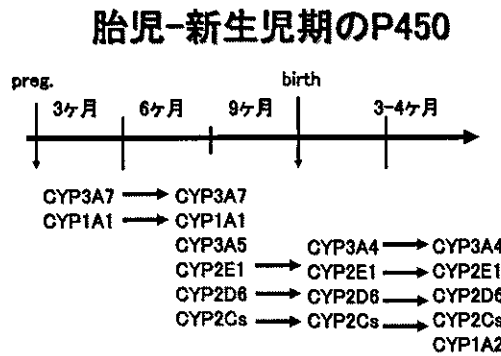


図2：ヒト胎児および新生児肝臓の CYP 発現するパターン。

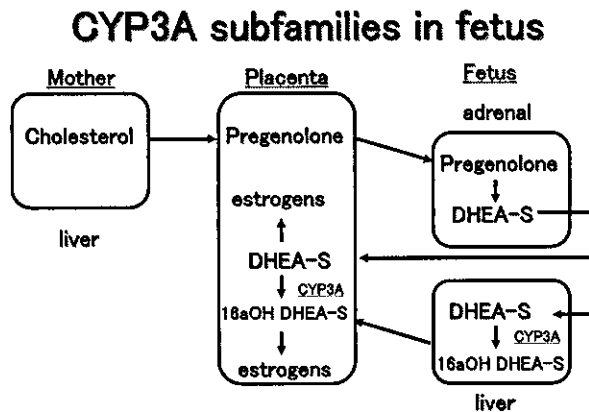


図3：CYP3A サブファミリーの役割。母親肝臓、胎盤、胎児肝臓におけるステロイドホルモンの代謝経路を示した。

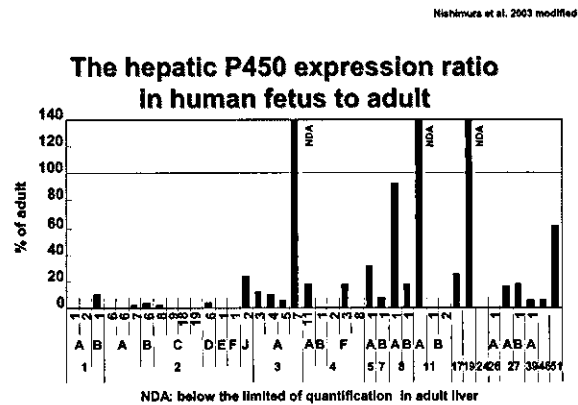


図4：ヒト胎児肝臓に発現する CYP mRNA パターン (Nishimura ら 2003 の文献より)。Real-time RT-PCR によって得られた各 CYP 発現レベルを、成人肝臓に対する相対地で補正した。

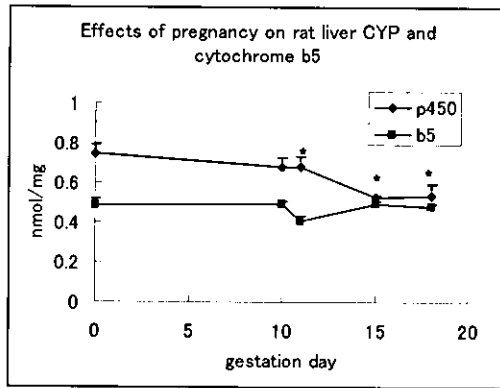


図5：妊娠ラット肝臓ミクロソームにおける P450 および cytochrome b5 の発現量の変化。
 (★； $p < 0.05$)

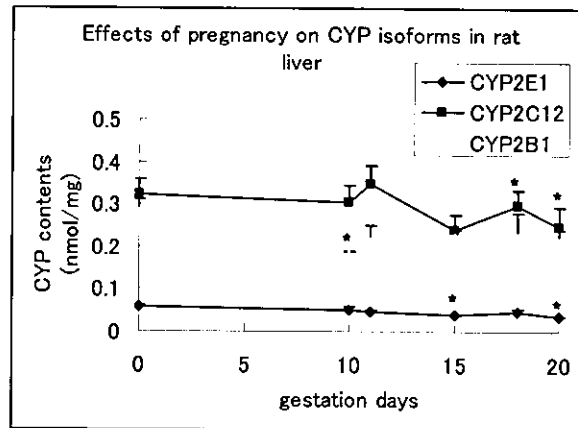


図6：妊娠ラット肝臓ミクロソームにおける P450 各分子種発現量の変化。(★； $p < 0.05$)

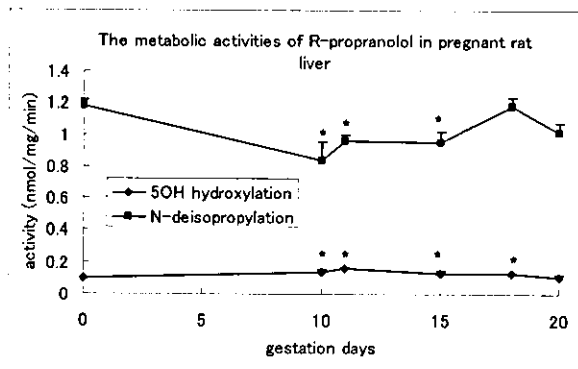


図7：妊娠ラット肝臓ミクロソームにおける propranolol 代謝活性。基質に R 体を用い、高基質濃度 1000 μ M で反応を行った結果を示す。(★； $p < 0.05$)

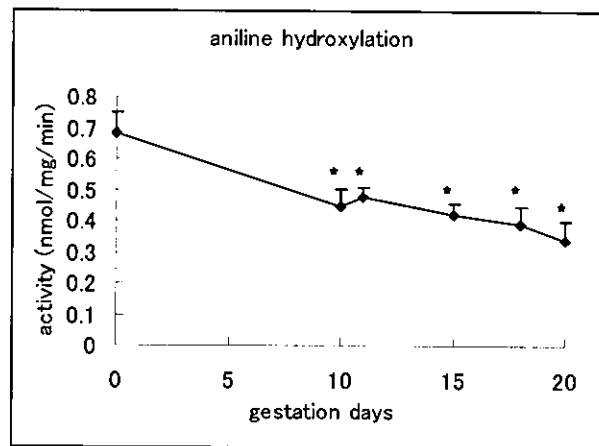


図8：妊娠ラット肝臓ミクロソームにおける aniline 水酸化活性の変動。(★； $p < 0.05$)

表2 妊娠ラット肝臓ミクロソームにおける薬物代謝活性の変動

基質	代謝反応	基質濃度	妊娠による変動（妊娠日齢）				
			10	11	15	18	20
CYP 量			±	±	—	—	—
propranolol (R 体)	4 位水酸化	5 uM	±	±	±	±	±
		1000uM	±	±	±	±	—
	5 位水酸化	5 uM	+	+	+	±	±
		1000uM	+	+	+	±	±
	7 位水酸化	5 uM	±	+	±	±	±
		1000uM	±	+	±	±	±
	N 脱イソプロピル化	5 uM	±	±	±	—	±
		1000uM	—	—	—	±	±
propranolol (S 体)	4 位水酸化	5 uM	±	±	±	±	±
		1000uM	±	±	±	±	±
	5 位水酸化	5 uM	±	±	±	±	±
		1000uM	±	±	±	±	±
	7 位水酸化	5 uM	±	±	±	±	±
		1000uM	±	±	±	±	±
	N 脱イソプロピル化	5 uM	±	±	—	±	±
		1000uM	±	±	±	±	±
imipramine	2 位水酸化	5 uM	±	±	±	±	±
		700uM	±	±	±	±	±
	N 脱メチル化	5 uM	±	±	±	±	±
		700uM	±	±	—	—	—
amitriptyline	trans10 位水酸化	5uM	±	±	±	±	±
	cis10 位水酸化	100uM	±	±	±	±	±
p-nitrophenol	水酸化	100uM	—	±	—	—	—
aniline	水酸化	2mM	—	—	—	—	—
ethanol	酸化	50mM	±	±	±	—	—

±：コントロール（妊娠0日目のメスラット）に比べて変化無し、+：有意に上昇、—：有意に減少

表 3. 多形アレイ遺伝子リスト

gene	ACC No.	allele	position	DNA	Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee
CYP1A1	X02612	wild	6819	A	
		2C	6819	G	2455A>G(I462V)
CYP1A2	dbSNP ID rs2069514	wild	-3860	G	
		1C	-3860	A	-3858G>A
CYP1B1	U56438	wild	4160	G	
		2	4160	T	355G>T(A119S)
		wild	8131	C	
		3	8131	G	4326C>G(L432V)
CYP2A6	U22027	wild	6867-	ttgt...	
		4	6867-	-	allele deletion
		wild	6416	T	
		7	6416	C	1412T>C(I471T)
CYP2C19	gi22051774(NT_030059)	wild	180546	G	
		3	180546	A	636G>A(stop codon)
		wild	1806252	G	
		2A	1806252	A	681G>A(splicing defect)
CYP2D6	M33189	wild			
		5	deletion		allele deletion
		wild	913	C	
		10	913	T	100C>T
GSTM1	gi22042153(NT_029860)	wild			
		0	deletion		allele deletion
GSTP1	M24485	wild	2627	A	
		1b	2627	G	I105V
NAT2	X14672	wild	1311	G	
		6	1311	A	590G>A(R197Q)
		wild	1578	G	
		7	1578	A	857G>A(G286E)
AhR	dbSNP ID rs2066853	wild		A	
		R554K		G	R554K
PPAR gamma	AB005520	wild	892	C	
		Pro12Ala	892	G	Pro12Ala

cytochrome P450 など異物代謝酵素遺伝子の多形解析と毒性評価 3

分担研究者 藤田 正一 北海道大学大学院獣医学研究科 教授

研究要旨

シトクロム P450 (P450, CYP) は広範な生物種に存在し、生理活性物質の生合成や、医薬品・環境汚染物質などの代謝排泄に関与する、生体のホメオスタシス維持の為に重要な酵素である。

CYP 遺伝多型による異物代謝能の違いは薬物や環境化学物質の薬効・毒性を決定する重要なファクターとなっている。P450 には様々な分子種が存在するが、様々な CYP 分子種の遺伝多形によって、薬物を中心とした外来異物のクリアランス、毒性発現が異なることが報告されている。そこで、P450 及びその制御機構に存在する遺伝多形について、新規 SNPs 解析方法の開発を試みた。本研究では、異物代謝酵素群及びその調節因子の遺伝的多形を一度に解析するために、新規マイクロアレイを作成した。

本研究では、ビオチンラベルした primer を用いて PCR product を生成した後、それらをガラスプレート上に貼り付けたオリゴ DNA にハイブリダイゼーションし、アビジン-HRP (horseradish peroxidase) によって TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) を発色させる方法をとった。血液あるいは毛髪ゲノムのサンプルを用いて解析を行い、今回作製した P450Chip の利点・改善点について考察した。

【研究協力者】

浦田 泰成 西條 泰明 堀川 尚子
佐藤 徹郎 吉岡 英治
(北海道大学大学院医学研究科予防医学講座
公衆衛生学分野)

A. 研究目的

Cytochrome P450(P450, CYP)は細菌、植物から哺乳類まで多くの生物種に存在し、ステロイドホルモンやビタミン、エイコサノイドなどの生理活性物質の生合成・代謝を行うと同時に、医薬品や環境汚染物質など、多くの外来異物代謝も担っている一酸素添加酵素である。CYP には様々な分子種が存在し、哺乳類では数百に及ぶ分子種が報告されている。

ヒトのゲノム情報 29 億塩基対の中には 300 万を超える SNP (single nucleotide polymorphism) が存在し、これらが遺伝病のみならず、医薬品や環境化学物質の感受性、生活習慣病の発症率、副作用リスクを決定していると考えられている。この SNP、特に P450 を中心とし

た薬物代謝関係の SNP を考慮したオーダーメイド (テーラーメイド) 薬物療法は近年製薬会社を中心に注目を集めてきた。国内ではゲノムプロジェクトの次世代プロジェクトとして、「オーダーメイド医療実現プロジェクト」が進行しており、SNPs 解析のために「30 万人計画」のサンプリングが行われている。international ではゲノム/ハプロタイプをマッピングする「HapMap 計画」が進行している。

昨年 12 月に、米国 FDA (Food and Drug Administration;食品医薬品局) はロシュが販売するヒト CYP2D6、CYP2C19 の SNPs を同定するマイクロアレイ「アンプリチップ CYP450」を臨床診断薬として認可した。研究向けにはアマシャムが P450 の SNP 検出の為にマイクロアレイ (CodeLink) を販売している。ロシュと Affymetrix 社によるアンプリチップ CYP450 は 29 アレルの CYP2D6、2 アレルの CYP2C19 を搭載しており、臨床医薬品の 25%の代謝と、世界人口の 99%の genotype をカバーされている。