

研究成果の刊行物・別冊

VI. 特 論

ニコチン依存の遺伝子解析

前田真貴子¹ 藤尾 慈² 東 純一¹

Genetic analysis for nicotine dependence

¹Makiko Maeda, ²Yasushi Fujio, ¹Junichi Azuma¹Department of Clinical Pharmacogenomics, School of Pharmacy,
Hyogo University of Health Sciences²Department of Clinical Pharmacology and Pharmacogenomics,
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

Abstract

Smoking cessation is extremely important to prevent the development of the serious diseases, such as COPD and cancers. Absorbed nicotine through smoking into the body is mainly metabolized by cytochrome P450 (CYP) 2A6. On the other, the nicotine acts in the brain through neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), which regulate the addictive properties of nicotine. Many associated studies have implicated genetic backgrounds influence smoking behavior and nicotine dependence. In these concepts, we here discuss the genes related to nicotine dependence from the pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of nicotine. Referring to the genome association studies, better understanding the molecular mechanisms of nicotine dependence would help to design targeted, more effective therapies for the tobacco-related diseases and smoking cessation program.

Key words: nicotine dependence, smoking, genetic analysis, gene polymorphism, genome-wide association studies

はじめに

喫煙は、虚血性心疾患、COPD、癌などの発症と深くかかわっていることは周知のことである。これら喫煙関連疾患の予防や治療に禁煙は必須であるが、多くの喫煙者は、禁煙の重要性を認識しながらもニコチン依存のため禁煙を達成できない。ニコチン依存形成には、環境要因と遺伝的要因とが深く関与しており、ニコチン依

存に関与する遺伝的要因を解析することは、ニコチン依存形成メカニズムを正しく理解することにつながる。

本稿では、ニコチン依存形成メカニズムと遺伝子解析によって明らかにされてきているニコチン依存に関連する遺伝子について概説する。

1. ニコチン依存形成メカニズム

ニコチンは肺から吸収され、直接、体循環系

¹兵庫医療大学薬学部 ²大阪大学大学院薬学研究科

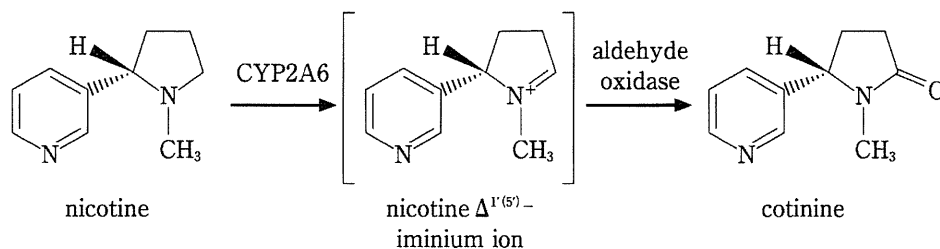


図1 ニコチンの代謝経路

CYP2A6: cytochrome P450 2A6.

(Clin Pharmacol Ther 67: 57-69, 2000 より引用)

表1 ニコチンによって分泌される神経伝達物質とその作用

ニコチンによって分泌される神経伝達物質	作用
ドパミン	快感, 食欲抑制
ノルエピネフリン	興奮, 食欲抑制
アセチルコリン	興奮, 認知力向上
セロトニン	気分変化, 食欲抑制
β-エンドルフィン	不安と緊張緩和

(左心系)に入り全身へ運搬され、主に肝臓の代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) 2A6 で代謝を受け、代謝物のコチニンへと変化する(図1)。ニコチンの血中半減期は短く(約30分~1時間程度)、取り込まれたニコチンが血液中に存在する時間はそれほど長くない。一方で、ニコチンは中枢神経系へ移行しやすい低分子であることより、体循環から速やかに血液脳関門を通過し中枢神経系へ移行し、中枢系に分布するニコチン性アセチルコリン受容体(nicotinic acetylcholine receptor: nAChR)と結合する。受容体と結合したニコチンは、ドパミン、ノルエピネフリンなどの神経伝達物質の分泌に働きかけ、脳内で表1に示すような作用を発現する。特に、中脳の腹側被蓋野や側坐核などのnAChRにニコチンが結合すると、ドパミン神経系の報酬回路を刺激し快感を与える。ニコチン濃度が低下すると脳へのこれらの直接的刺激が減少し、不快感、苛立ち、睡眠障害などの離脱症状が引き起こされるため、再度、刺激を得るためにニコチンを強く欲求するようになる。このような喫煙サイクルを介し、ニコチン依存が形成されていく。

すなわち、ニコチン依存形成には、体内のニコチン量とニコチンが受容体と結合した後に薬物として発現する作用の強さの両者がかかわる。

2. ニコチン依存に関連する遺伝子と遺伝子解析

a. ニコチンの体内動態に関与する遺伝子

前述したとおり、血中のニコチン量は、ニコチン代謝の主酵素であるCYP2A6の活性と深く関与する。更に、CYP2A6活性は、CYP2A6遺伝子型に依存することが報告されている¹⁾。

CYP2A6遺伝子型が喫煙に与える影響について白人を対象に行った研究では、CYP2A6無活性となる遺伝子型をもつことで代謝能が低い喫煙者の方が、1週間あたりの喫煙本数が有意に少ないことが示されている(図2)²⁾。また、著者らも日本人を対象とした研究で、CYP2A6遺伝子多型の存在によりCYP2A6の酵素活性が低下している喫煙者よりも、CYP2A6の酵素活性が高い喫煙者で強いニコチン依存を示す傾向があることを報告した³⁾。これらは、CYP2A6の酵素活性が低下することで、ニコチンが比較的長時間血中にとどまり、ニコチンを脳内に供給するための喫煙本数が少なくなることによると考えられている(表2)。

2010年には、全ゲノム関連解析(genome-wide association studies: GWAS)によって、19q13遺伝子座位に存在するCYP2A6遺伝子変異のほかにCYP2B6の遺伝子変異がニコチン依存に関与する可能性が報告された⁴⁾。CYP2B6の発現量と活性はCYP2A6に比べわずかで、ニコチン代謝への寄与は低いとされているが⁴⁾、

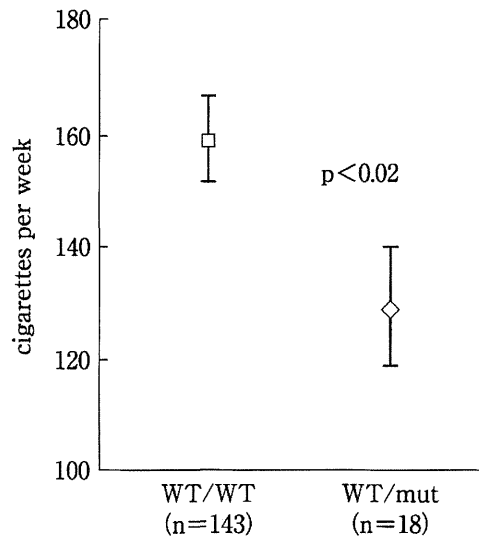


図2 CYP2A6 遺伝子型と喫煙との関連

喫煙者を対象とした CYP2A6 遺伝子型の違いによる 1 週間あたりの喫煙本数の比較(平均値 ± S.D.).

WT/WT: 2 対とも CYP2A6 野生型を保有する喫煙者, WT/mut: CYP2A6 野生型と CYP2A6 無活性型を保有する喫煙者.
(文献²⁾より引用)

表 2 CYP2A6 遺伝子型とニコチン代謝酵素活性との関係

CYP2A6 遺伝子型	ニコチン代謝酵素活性変化による喫煙本数への影響
CYP2A6*1/*1	ニコチン代謝能が正常で喫煙本数が増える傾向にある
CYP2A6*1/*9 CYP2A6*1/*7 CYP2A6*1/*4	*1/*1 保持者より酵素活性がやや低下することより, *1/*1 保持者より喫煙本数が少なくなる傾向にある
CYP2A6*9/*9 CYP2A6*7/*9 CYP2A6*7/*7	*1 保持者よりも更に酵素活性が低下することより, 喫煙本数は, *1 保持者よりも少なくなる傾向にある
CYP2A6*4/*7 CYP2A6*4/*9	*1/*1 保持者に比べ酵素活性がかなり低くなり, 喫煙本数が少ない傾向にある
CYP2A6*4/*4	酵素活性が消失しているため, 喫煙本数が少ない人が多い

注)CYP2A6 の遺伝子型を *4, *7, *9 とその他(*1)のタイプで分類した場合.

喫煙者の脳内で CYP2B6 の発現が上昇していることなどが報告されている⁵⁾. 著者らもタバコ煙に含有される成分が CYP2B6 の発現を誘導することを報告した⁶⁾. これらのことより, CYP2A6 活性の低い喫煙者では, CYP2B6 もニコチンの代替代謝経路として機能し, ニコチン依存形成に寄与する可能性が考えられる.

b. ニコチンの作用部位にかかわる遺伝子

ニコチンが受容体と結合した後に薬物とし

て発現する作用の強さは, ニコチン受容体の性質に依存する. すなわち, ニコチン受容体の nAChR には複数のサブユニットが存在するが, それらサブユニットの遺伝子型がニコチンの作用発現に影響を及ぼすことでニコチン依存形成にかかわる. 近年の GWAS およびそれらを用いたメタ解析の成果から, 15q25 遺伝子座位に存在する nAChR の $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 4$ サブユニット遺伝子 (CHRNA3, CHRNA5, CHRNB4) の遺伝

子変異や 8p11 遺伝子座位に存在する $\alpha 6$, $\beta 3$ サブユニット遺伝子 (*CHRNA6*, *CHRNA3*) の遺伝子変異がニコチン依存に関与する可能性があることが報告されている^{4,7,8)}。

これらの GWAS でニコチン依存との関連が認められた遺伝子については、遺伝子改変動物などを用い、遺伝子の機能解析が行われ、ニコチン依存形成メカニズムにおける役割が解明されてきている⁹⁾。

おわりに

ニコチン依存形成にかかわる遺伝子解析およ

びそのメカニズム解明により、ニコチンが他の違法薬物による依存症と同様に強い依存性を惹起する薬物であることが理解できる。また、科学的根拠に基づいたニコチン依存症形成メカニズムの理解が、効果的な禁煙指導実施に有益な情報提供を可能にする。今後、ニコチン依存形成過程のみならず、ニコチン離脱時に伴う諸症状に関する遺伝子解析研究成果が、有益な禁煙支援の一助となり、喫煙者のみならず受動喫煙者がタバコによる健康被害から守られることを期待する。

■ 文 献

- 1) Nakajima M, et al: Comprehensive evaluation of variability in nicotine metabolism and CYP2A6 polymorphic alleles in four ethnic populations. *Pharmacogenet Genomics* 80 (3): 282-297, 2006.
- 2) Pianezza ML, et al: Nicotine metabolism defect reduces smoking. *Nature* 393: 750, 1998.
- 3) Kubota T, et al: *CYP2A6* polymorphisms are associated with nicotine dependence and influence withdrawal symptoms in smoking cessation. *Pharmacogenomics J* 6: 115-119, 2006.
- 4) Thorgeirsson TE, et al: Sequence variants at *CHRNA3-CHRNA6* and *CYP2A6* affect smoking behavior. *Nat Genet* 42: 448-454, 2010.
- 5) Miksys S, et al: Smoking, alcoholism and genetic polymorphisms alter CYP2B6 levels in human brain. *Neuropharmacology* 45: 122-132, 2003.
- 6) Washio I, et al: Cigarette smoke extract induces CYP2B6 through constitutive androstane receptor in hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 39: 1-3, 2011.
- 7) Liu ZJ, et al: Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity. *Nat Genet* 42: 436-440, 2010.
- 8) Boezen HM: Genome-wide association studies: what do they teach us about and chronic obstructive pulmonary disease? *Proc Am Thorac Soc* 6: 701-703, 2009.
- 9) Fowler CD, et al: Habenular $\alpha 5$ nicotinic receptor subunit signaling controls nicotine intake. *Nature* 471: 597-603, 2011.

禁煙治療薬の個別化適正投与法確立に向けたゲノム薬理学的研究

Pharmacogenomics study to apply the personalized medication
to smoking cessation program

前田 真貴子^{*1} 藤尾 慈^{*2} 東 純一^{*3}

Key words : 喫煙、薬物代謝酵素、遺伝子多型、CYP2A6、CYP2B6

はじめに

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) や肺ガン、動脈硬化性疾患などの予防や治療に、禁煙は必須である。禁煙を望む喫煙者は増加しているが、その多くはタバコに含まれるニコチンに対する依存 (ニコチン依存) のために、禁煙達成に困難を要する。したがって、効果的な禁煙指導を行うことは、健康増進という観点から非常に重要である。我々はこれまで、ニコチン依存形成の個体差はニコチンの体内動態の個体差 (薬物動態学的) および中枢ニコチン作動性ニューロン (およびその関連ニューロン) でのニコチン作用の個体差 (薬力学的) により生じると考え、両観点から、ニコチン依存形成・喫煙習慣の個体差をゲノム薬理学的に解析してきた。薬物動態学的個体差の側面から、ニコチン代謝にはCytochrome P450 (CYP) 2A6が関与していることより、107名の日本人男性喫煙者を対象に調査研究を行った結果、CYP2A6遺伝子多型によるニコチン体内動態の個体差がニコチン依存に影響を及ぼすことを報告した¹⁾。すなわち、CYP2A6の酵素活性が高い喫煙者 (CYP2A6 *1/*1、*1/*9、*1/*4、*9/*9保持者) ではCYP2A6の酵素活性が低い群 (CYP2A6 *4/*9、*4/*4保持者) よりも強いニコチン依存を示すということであった。次に、薬力学的個体差の側面からは、脳内報

酬回路に関与する遺伝子など、中枢神経系においてニコチン依存に影響すると予測されるものの内から18遺伝子37遺伝子多型に着目し、ニコチン依存との関連を検討した。薬物動態学的要因を除くため、CYP2A6高活性群 (体内からニコチンが速やかに代謝される群) の日本人男性喫煙者293名を対象に、生活環境要因を考慮し、同じ職場に勤務する135名を第1群、ランダムに組み入れた158名を第2群に分類した。第1群の喫煙者を対象に選定した遺伝子について関連解析を行い4遺伝子13遺伝子多型に絞り込み、更に第2群において再解析を行った結果、ニコチン性アセチルコリン受容体 α_4 サブユニット (*CHRNA4*) 遺伝子多型 (SNP ID ; *rs2273504*, G/A) が、ニコチン依存の個体差に影響を及ぼす可能性が示唆された。すなわち、CYP2A6高活性の喫煙者において*CHRNA4 rs2273504*のG/GまたはG/A保有者は、ホモ変異接合体A/A保有喫煙者と比較して強いニコチン依存を示す者の割合が高いということを報告した²⁾。*CHRNA4 rs2273504*は、バレニクリン (商品名: チャンピックス、ファイザー) の標的遺伝子に存在しており、2008年1月に我が国でも $\alpha_4\beta_2$ ニコチン受容体部分作動薬である経口禁煙補助薬のバレニクリンが製造承認された。しかし、先行してバレニクリンが販売されている米国では副作用 (吐き気、頭痛、うつ、自殺願望) に対する警告も

*1 MAEDA MAKIKO 兵庫医療大学 薬学部 医療薬学科

*2 FUJIO YASUSHI 大阪大学大学院薬学研究科

*3 AZUMA JUNICHI 兵庫医療大学 薬学部 医療薬学科

FDAより出されたことより、今後の禁煙治療は、個人の体質に合わせ、ニコチンパッチもしくはバレニクリンを選択することが重要になると考えられる。

しかしながら、これまでのCYP2A6遺伝子型の判定では、アミノ酸置換 (I471 T) を伴うことで酵素活性が低下するCYP2A6*7の遺伝子型³⁾の判定を行っていない。このことは、これまでの判定結果で*1 (高活性群に群別) とされた喫煙者が*7と判定されることで、低活性群に群別される可能性があることより、*7の判定を行い、詳細にニコチン依存度とCYP2A6遺伝子型との関係について再検討する必要があると判断した。

更に、これまでの調査で、同じCYP2A6遺伝子型の喫煙者集団内にもニコチン依存度にvariationが存在することより、喫煙によるニコチン代謝酵素活性の誘導について検討する必要があると考えた。これまで、CYP2B6がニコチンの代謝に関与し、喫煙者の脳内でCYP2B6の発現が上昇することは、既に報告されているが、そのメカニズムの詳細は不明である⁴⁾。

このような背景から、以下の研究を進めることとした。

1. ニコチン依存に関連する薬物動態学的、および薬力学的要因の遺伝子型を組み合わせることで適切な禁煙治療プログラムを確立することを目的とした多施設臨床試験を行うことを計画するに先立ち、CYP2A6遺伝子型による群別をより詳細

に行い、これまでの結果を再検する。

2. ニコチンによるニコチン代謝酵素CYP2B6の発現誘導の可能性とそのメカニズムについて、培養細胞 (ヒト肝ガン由来細胞株HepG2) を用いて検討する。

方 法

対象

本研究への参加協力について文書による同意を得ることのできた男性喫煙者414名。

対象喫煙者の背景を表1に示す。

ニコチン依存度の算出

被験者を対象に喫煙習慣について調査し、1日の喫煙本数と起床後最初に喫煙するまでの時間について、それぞれのHeaviness of Smoking Index (HSI) score (表2) を求め、合計scoreを算出した。

遺伝子型の判定

末梢血よりゲノムDNAを採取し、CYP2A6*1および*4はPCR-RFLP法で、CYP2A6*7と*9はAllele-specific primer PCR法で、CHRNA4 rs2273504は、TaqMan法を用い、それぞれの遺伝子型の判定を行った。

倫理的配慮

臨床研究を行うにあたっては、大阪大学ゲノム

表1 対象喫煙者の背景 (平均±標準偏差)

年齢 (歳)	51.6 ± 13.7
喫煙開始年齢 (歳)	19.7 ± 5.2
喫煙期間 (年)	30.5 ± 13.1

表2 Heaviness of Smoking Index (HSI)

score	0	1	2	3
1日の喫煙本数 (本)	< 10	11-20	21-30	>31
起床後最初に喫煙するまでの時間 (分)	>61	31-60	6-30	< 5

倫理委員会、兵庫医療大学倫理委員会の承認を得た。

タバコ煙抽出物の調整

タバコ煙抽出物 (Cigarette Smoke Extract ; CSE) の調整は、これまでの報告⁵⁾を基に、吸引機を用いてタバコ (セブンスター®) の煙を Phosphate Buffer Saline (PBS) にくぐらせることにより作製した (図1)。調整を行う際には、10本のタバコを吸引し、20mLのPBSにくぐらせたものを100%抽出液とした⁶⁾。

ヒトconstitutive androstane receptor (hCAR) アデノウィルスベクターの作製

これまでの報告⁷⁾を参考に、ヒト肝臓cDNAライブラリーからPCRにより下記プライマーを用い hCAR cDNAを増幅した。

Forward ; GGG GAA TTC ATG GCC AGT AGG
GAA GAT GAG CTG AGG AAC TGT GTG GTA
TGT GG

Reverse ; GGG AAG CTT TCA GCT GCA GAT
CTC CTG GAG CAG CGG CAT CAT GGC AG

増幅されたPCR産物をpCCMVpLpAベクターに組み込んだ後、pJM19ベクターとともにHEK293

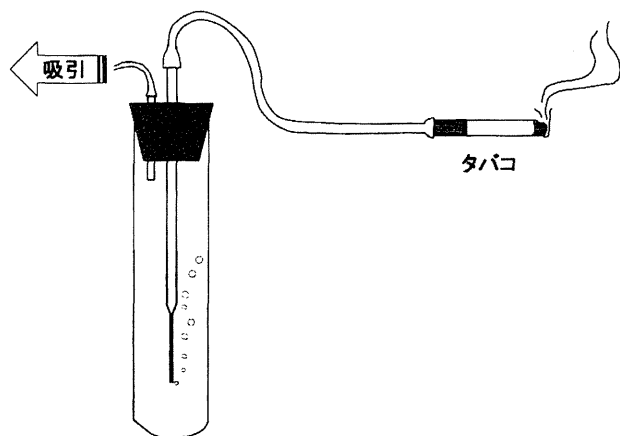


図1 タバコ煙抽出物の調整方法

吸引機を用いてタバコを吸引し、PBSにくぐらせることにより作製した。10本のタバコを20mLのPBSを介して吸引したものを100%抽出液とした。

細胞にco-transfectionすることによりアデノウィルスベクターを作製した。作製したアデノウィルスの構造(図2-A)とアデノウィルスを導入したHepG2細胞のhCAR 蛋白発現の確認を示す (図2-B)。

細胞培養

ヒト肝ガン由来細胞株HepG2を10% fetal bovine serum (FCS) 入りEagle's Minimum Essential Medium (EMEM) を用いて培養実験に供した。

遺伝子導入

作製したアデノウィルスベクターによるhCARの遺伝子導入は、アデノウィルスによる感染24時間後に、アデノウィルスベクターを含まないEMEM培地 (10%FCS含む) に交換し、更に24時間培養

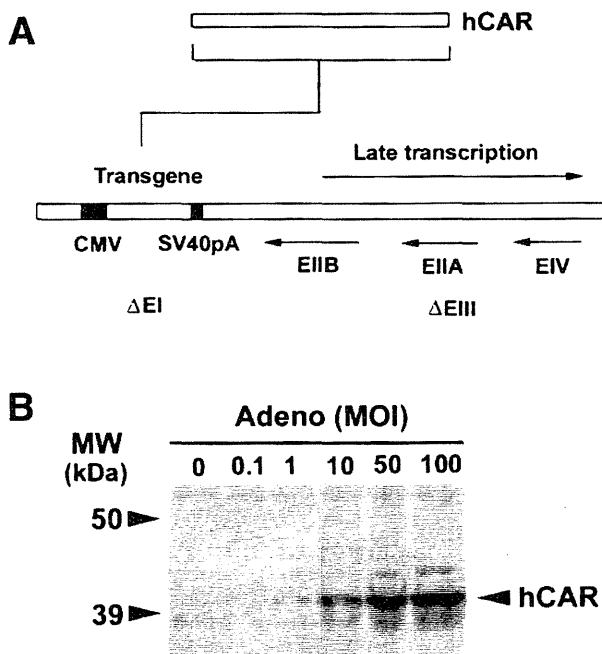


図2 アデノウィルスの構造(A)とhCAR蛋白発現の確認(B)
(A) 作製したhCARアデノウィルスベクターの構造。
(B) HepG2細胞に、作製したhCARアデノウィルスベクターを用い、0、0.1、1、10、50、100 MOIで遺伝子導入を行った。一定時間培養後、細胞抽出液と抗hCAR抗体 (Santa Cruz Biotechnology製品) を用い、ウェスタンブロッティング法によりhCAR 蛋白発現を確認した。

することにより行った。その後、終濃度7%になるようCSEを加え、各遺伝子発現解析を行った。

遺伝子発現解析

CYP2B6, CYP1A2, hCAR, GAPDHの各mRNA発現について、real time RT-PCR法を用いて行った。

統計解析

ニコチン依存度と遺伝子型との関連解析には、 χ^2 検定を用いた。平均値の差については、t検定、一元配置分散分析、多重比較検定法を用いて解析を行った。

結 果

1. CYP2A6遺伝子型が1日喫煙本数に及ぼす影響
喫煙者全体の1日の平均喫煙本数は、27.4本、

各群の1日平均喫煙本数は、表3に示す通りであった。**1/*1*、**1/*9*、**1/*4*、**1/*7*、**9/*9*の平均喫煙本数は対象者全員の平均値よりも高い値を示し、CYP2A6遺伝子型が1日の喫煙本数に影響を与えることが示唆された。各群の喫煙本数の分布を図3に示す。

2. CYP2A6遺伝子型がHSI scoreに及ぼす影響

各群におけるHSI scoreの平均値を表4に示す。1日の喫煙本数同様、**1/*1*、**1/*9*、**1/*4*、**1/*7*、**9/*9*の各群でHSI scoreは4以上を示した。

3. CYP2A6遺伝子型がニコチン依存度に及ぼす影響

これまでのCYP2A6によるニコチン代謝能の報告²⁾を基に、**1/*1*、**1/*4*、**1/*7*、**1/*9*、**9/*9*を

表3 各genotypeにおける平均喫煙本数

genotype	<i>*1/*1</i>	<i>*1/*9</i>	<i>*1/*4</i>	<i>*1/*7</i>	<i>*9/*9</i>	<i>*4/*9</i>	<i>*4/*7</i>	<i>*4/*4</i>	<i>*7/*7</i>	<i>*7/*9</i>
n	116	102	60	34	20	27	29	16	9	1
mean \pm S.D.	29.3 \pm 15.5	29.5 \pm 13.4	28.2 \pm 12.0	28.3 \pm 15.6	29.5 \pm 10.0	22.6 \pm 10.5	21.5 \pm 10.5	19.0 \pm 6.1	19.7 \pm 7.6	12.0

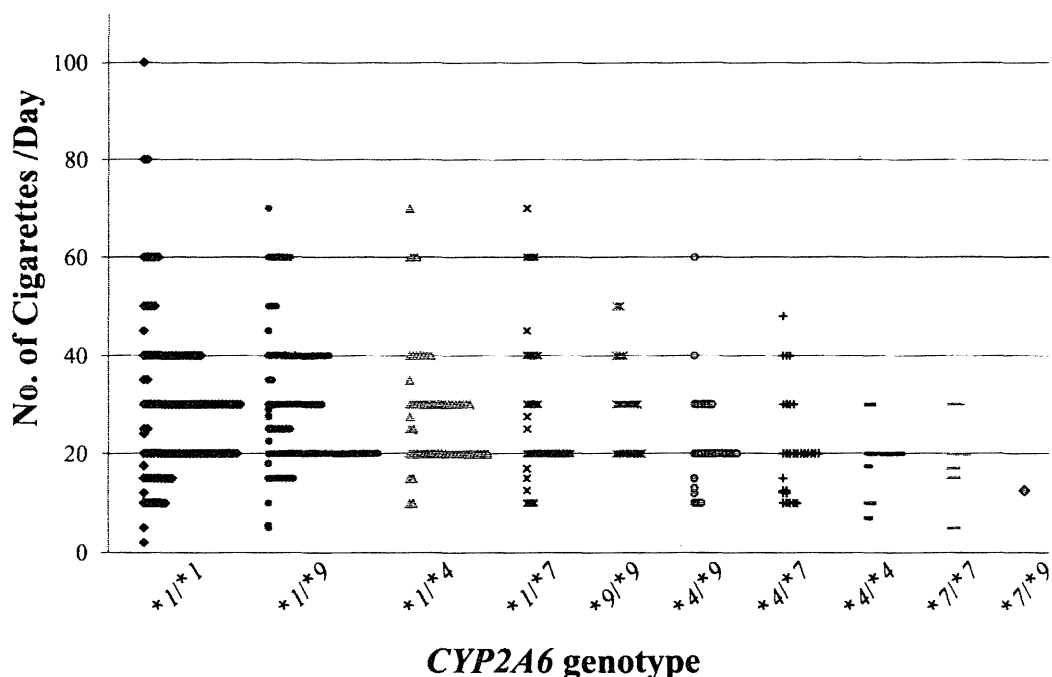


図3 CYP2A6遺伝子型と1日の喫煙本数の関係

対象喫煙者全員 (n=414) の平均喫煙本数 \pm 標準偏差; 27.4 \pm 13.5本。

表4 各genotypeにおける平均HSI score±標準偏差

genotype	*1/*1	*1/*9	*1/*4	*1/*7	*9/*9	*4/*9	*4/*7	*4/*4	*7/*7	*7/*9
n	116	102	60	34	20	27	29	16	9	1
mean ± S.D.	4.1 ± 1.6	4.0 ± 1.4	4.0 ± 1.3	4.1 ± 1.4	4.2 ± 1.4	3.1 ± 1.2	3.1 ± 1.6	3.1 ± 1.4	3.4 ± 1.3	3.0

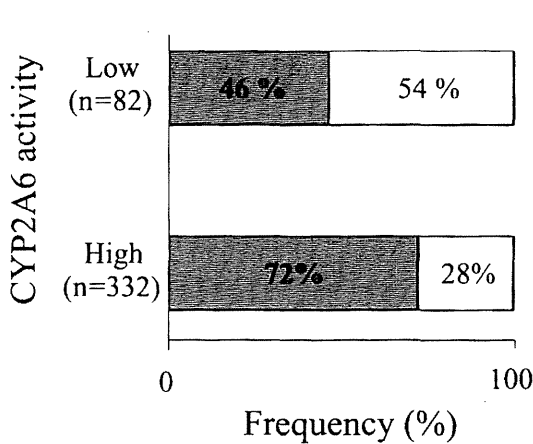


図4 CYP2A6遺伝子型とニコチン依存度との関係

Low (n=82) ; CYP2A6低活性群、CYP2A6 *4/*4、*4/*7、*4/*9、*7/*7、*7/*9、High (n=332) ; CYP2A6高活性群、CYP2A6 *1/*1、*1/*4、*1/*7、*1/*9、*9/*9、塗潰し部分；HSI scoreが4以上の喫煙者の割合、白抜き部分；HSI scoreが4未満の喫煙者の割合、関連解析は、 χ^2 検定を用いて行った； χ^2 (df=1、n=414)=19.5、 $\phi=0.22$ 、 $P<0.01$ 、OR=2.98、95% CI=1.81-4.89、OR；オッズ比 (odds ratio)、CI；信頼区間 (confidence interval)、df；自由度、 ϕ ；四分点相関係数 (phi coefficient)。

CYP2A6高活性群、その他の群をCYP2A6低活性群とし、各群における強いニコチン依存度を示す割合を検討したところ、CYP2A6高活性群において強いニコチン依存度を示す割合が有意に高かった (図4)。

4. CHRNA4 rs2273504遺伝子型がニコチン依存度に及ぼす影響

CHRNA4 rs2273504 (G/A) 遺伝子型がニコチン依存度に及ぼす影響について検討したところ、G alleleを保有する群 (AG+GG) において強いニコチン依存を示す割合が高かった (図5)。更に、CYP2A6活性がこれらの関係に及ぼす影響を考

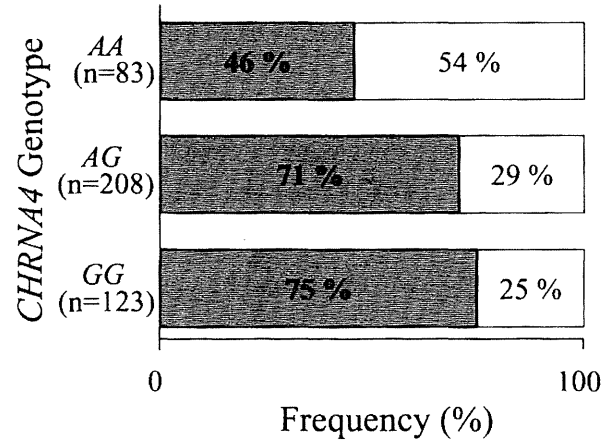


図5 CHRNA4 rs2273504遺伝子型とニコチン依存度との関係

塗潰し部分；HSI scoreが4以上の喫煙者の割合、白抜き部分；HSI scoreが4未満の喫煙者の割合、関連解析は、 χ^2 検定を用いて行った； χ^2 (df=2、n=414)=21.5、 $\phi=0.23$ 、 $P<0.01$ 、df；自由度、 ϕ ；四分点相関係数 (phi coefficient)。

え、対象群をCYP2A6高活性群と低活性群に分け、同様の解析を行った。その結果、図6に示す通り、CYP2A6高活性群においては、CHRNA4 rs2273504 遺伝子型にG alleleを保有する喫煙者では強いニコチン依存を示す割合が有意に高かった。一方、CYP2A6低活性群ではその傾向を認めることができなかった。

5. CSEによるCYP2B6 mRNA の発現誘導

7%のCSEを含む培地でHepG2細胞を培養し、CYP1A2とCYP2B6のmRNA発現量を検討したところ、CSE処理によりCYP1A2発現は増強したが (図7-A)、CYP2B6は発現上昇しなかった (data not shown)。

これまで、CYP2B6はhCARにより発現誘導されることが知られているが、HepG2細胞のような培養肝細胞では、生体肝と比べhCARの発現量

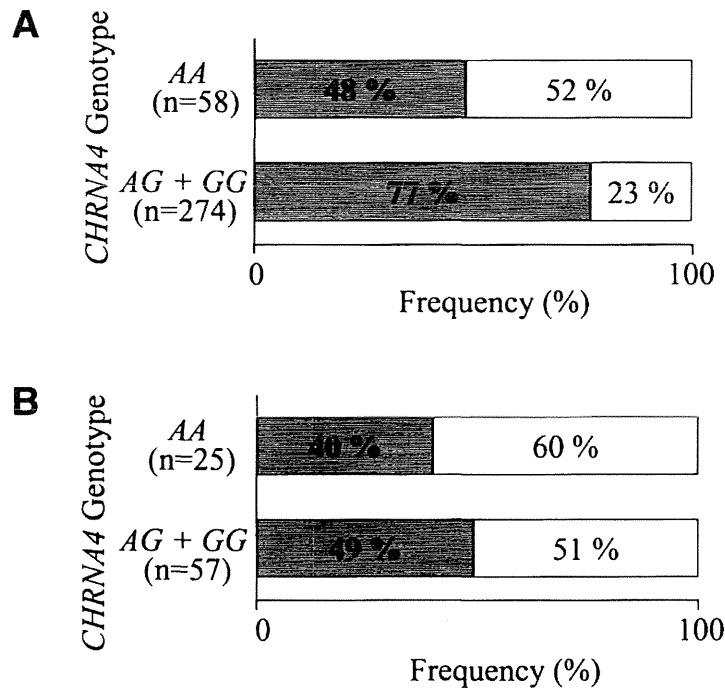


図6 *CHRNA4* rs2273504遺伝子型とニコチン依存度との関係にCYP2A6活性が及ぼす影響関連解析をCYP2A6高活性、低活性の各群において、*CHRNA4* rs2273504遺伝子型とニコチン依存度との関係について、 χ^2 検定を用いて行った。塗潰し部分；HSI scoreが4以上の喫煙者の割合、白抜き部分；HSI scoreが4未満の喫煙者の割合。
 (A) CYP2A6高活性群 (CYP2A6 *1/*1, *1/*4, *1/*7, *1/*9, *9/*9) のみを対象として解析、 χ^2 ($df=1$, $n=332$)=19.6, $\phi=0.24$, $P<0.01$, OR=3.58, 95% CI=2.00-6.45。
 (B) CYP2A6低活性群 (CYP2A6 *4/*4, *4/*7, *4/*9, *7/*7, *7/*9) のみを対象として解析、 χ^2 ($df=1$, $n=82$)=0.58, $\phi=0.08$, $P=n.s.$, OR=1.45, 95% CI=0.56-3.76, OR；オッズ比 (odds ratio)、CI；信頼区間 (confidence interval)、 df ；自由度、 ϕ ；四分点相関係数 (phi coefficient)。

が少ないとされている。そこで、HepG2細胞におけるhCARの発現量を検討することとした。その結果、HepG2細胞では、hCARの発現は、ヒト肝細胞と比較して100分の1以下であることが明らかとなった (図7-B)。

そこで、HepG2細胞にhCARを発現するアデノウイルスベクターもしくはコントロール (β -gal) ベクターを導入し、CSEで刺激した。その結果、図7-Cに示すように、hCARを導入することによりCYP2B6の発現は増強するが、コントロールベクターでは発現は増強されなかった。また、CYP2A6の発現量は、hCARアデノウイルスベクター導入程度に応じ増強した。

一方、hCARの遺伝子導入のCYP1A2発現に対する影響を検討したところ、図7-Dに示すように、ベクターを導入していない細胞、hCARを導入した細胞、コントロールベクターを導入した細胞のいずれにおいてもCSE刺激によるCYP1A2の発現上昇は、ほぼ同程度であり、統計学的有意差は認められなかった。

考 察

本研究において、CYP2A6および*CHRNA4* rs2273504遺伝子型とニコチン依存度との関係について、症例数を増やし、詳細に検討を行った。本研究においては、CYP2A6*7の判定を加え喫煙

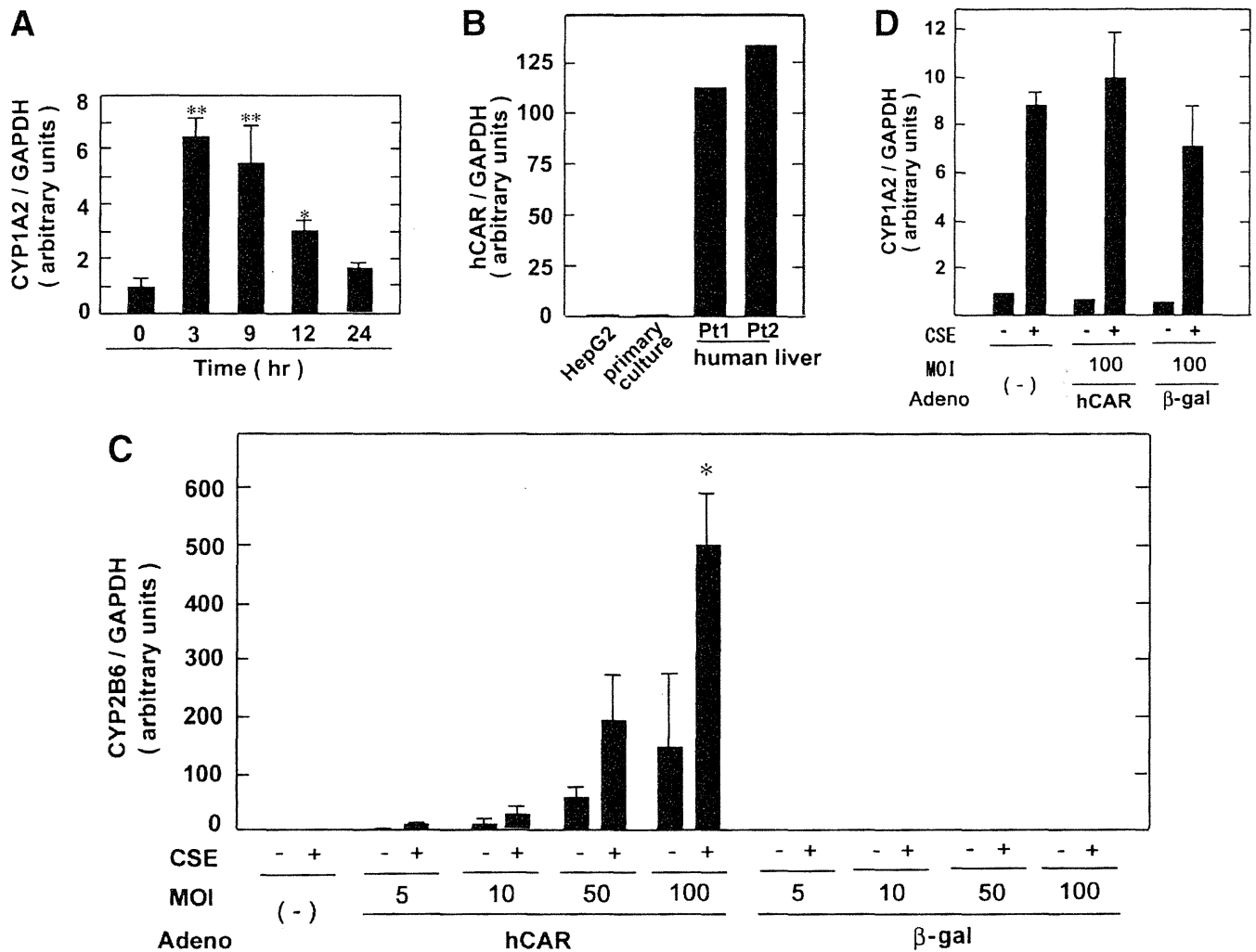


図7 CSEによる、CYP1A2(A)、hCAR(B)、CYP2B6(C)、CYP1A2(D)の誘導

- (A) 7% CSEを含む培地でHepG2細胞を培養した。CYP1A2 mRNAの発現はreal-time RT-PCR法にて行い、内部標準にはGAPDHを用いた。データは、4回行った実験の平均値±標準偏差を示す。統計解析は、テューキー・クレーマー法による多重比較検定にて有意検定を行った。**； $P < 0.01$ v.s. 0 hr。*； $P < 0.05$ v.s. 0 hr。
- (B) HepG2細胞、初代培養肝細胞、ヒト肝細胞におけるhCAR mRNA発現量の確認。内部標準にはGAPDHを用いた。縦軸は、HepG2細胞のhCAR発現量に対する比を示す。
- (C) hCARもしくはβ-galのアデノウィルスベクターをHepG2細胞に導入後、7% CSEで24時間培養した後、CYP2B6 mRNA発現量をreal time RT-PCR法で確認した。データは、3回行った実験の平均値±標準偏差を示す。2群間の平均値の差の検定は、対応のない検定法を用いた。*； $P < 0.05$ v.s. CSE (-)。
- (D) 100MOIでhCARもしくはβ-galのアデノウィルスベクターをHepG2細胞に導入後、7% CSEで24時間培養した後、CYP1A2 mRNAの発現量をreal-time RT-PCR法にて確認。内部標準にはGAPDHを用いた。データは、3回行った実験の平均値±標準偏差を示す。CSE処置群間での統計学的有意差は認められなかった。

者を群別して検討したが、これまでの研究結果同様、CYP2A6遺伝子型がニコチン依存度の個体差に影響を及ぼしていることが明らかとなった。すなわち、CYP2A6高活性群では強いニコチン依存症を示す被験者の割合が高いことが示された。

CYP2A6高活性群においては、喫煙により体内に取り込まれたニコチンがより早く消失するため、1日の喫煙本数が増加し、また起床時にニコチンが体内に殆ど存在しないため、起床後すぐに喫煙するものと考えられる。また、高い濃度のニ

コチンは、悪心・嘔吐等を引き起こすことが知られており⁹⁾、CYP2A6低活性群においては、血中ニコチン濃度が異常に高くないように、無意識のうちに、喫煙によるニコチン摂取を自己制御している可能性が考えられる。

また、*CHRNA4 rs2273504* 遺伝子型とニコチン依存との関係においては、CYP2A6高活性群においては、*CHRNA4 rs2273504* 遺伝子型がニコチン依存度に影響を及ぼすことが示唆されたが、CYP2A6低活性群では、*CHRNA4 rs2273504* 遺伝子型の影響を認めることはできなかった。このような結果となった理由としては、受容体の脱感作への影響による可能性を想定している。つまり、喫煙により体内に取り込まれたニコチンは、脳内のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) を活性化し、神経終末のドーパミン放出を促進し、快感や多幸感を増強するが、数分後にニコチン結合能の高い $\alpha_4\beta_2$ nAChRは脱感作し、ニコチンによるドーパミン神経の刺激が、減少または消失することが報告されている^{9, 10)}。しかし、ニコチン代謝能の低いCYP2A6低活性群には、ニコチンへの長時間曝露により脱感作の状態が続くことになり、喫煙してもニコチンによるドーパミン遊離が起こらなくなることでニコチン依存が形成されにくくなるのではないかと、いうものである。一方、CYP2A6高活性群では、脱感作の状態が続きにくいいため、*CHRNA4*多型の影響が認められたのではないかと考える。

また、マウスにおいて、ニコチン曝露によりニコチン自己投与行動が惹起されることが知られており¹¹⁾、これはヒトにおける喫煙反復行動に相当すると考えられる。しかし、*CHRNA4*ノックアウトマウスでは、ニコチン曝露してもドーパミンの遊離は起こらず、ニコチンの自己投与行動が惹起されないことが報告されている¹²⁾。今回、判定を行った*CHRNA4 rs2273504*は、イントロンに存在するもので、この多型が受容体機能に及ぼす影響については明らかになっていないが、変異 (A allele) を有することで機能低下に関与すると仮定した場

合、A/A群においては、受容体の機能低下によって、ニコチン刺激によるドーパミンの遊離が抑制され、喫煙による満足感が十分に得られないことより、ニコチン依存が形成されにくくなっていることが考えられる。

更に、本研究では、細胞生物学的観点から喫煙によるCYP2B6の誘導を検討することとし、hCARアデノウィルスベクター発現系と組み合わせることで、CSEを用いて薬物代謝酵素の発現解析を行った。これまで、CSEは細胞障害に関する研究で多く用いられてきているが、その結果、タバコ煙の中には、hCARのリガンドとなる物質が存在しており、その物質の刺激により、ニコチンの代謝酵素のひとつCYP2B6の発現が誘導されることが明らかとなった。タバコ煙はarylhydrocarbon receptor (AhR) を介してCYP1A2の発現を誘導することが知られているが、本研究によって、タバコ煙の薬物代謝酵素発現への影響の新しいメカニズムとして、hCARを介した酵素誘導の可能性を示すこととなった。また、CYP2A6低活性の喫煙者にとって、代替のニコチン代謝に僅かながらCYP2B6が寄与することはこれまでに報告されている^{13, 14)}。今回の結果から、喫煙によってCYP2B6が誘導されることで、CYP2A6の代替の代謝経路として機能し、CYP2A6低活性群の喫煙者のニコチン依存形成に寄与する可能性が考えられる。今後更なる検討を行い、CYP2A6と*CHRNA4*を介するニコチン依存形成メカニズムについて詳細に解析する予定である。

現在、禁煙治療として、ニコチン代替療法とニコチン受容体部分作動薬として知られるバレニクリンが用いられている。喫煙習慣が形成されるに至るまでには、遺伝要因と環境要因が深く関与しているが、本研究成果が有益な禁煙治療に応用できるよう、引き続き研究を続ける予定である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたってご支援頂いた財団法人臨床薬理研究振興財団に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Kubota T, Ueki R, Fujio Y, Azuma J, et al. CYP2A6 polymorphisms are associated with nicotine dependence and influence withdrawal symptoms in smoking cessation. *Pharmacogenomics J* 2006; **6**: 115-9.
- 2) 植木理紗, 谷口智子, 丹下悦子, 久保田智子, 南畝晋平, 船本全信, 三浦源太, 前田真貴子, 藤尾慈, 東純一. 科学的根拠に基づいた禁煙指導に向けて～ニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 4$ サブユニット(*CHRNA4*)多型のニコチン依存性に及ぼす影響～. *臨床薬理* 2006; **37(suppl)**: S128.
- 3) Nakajima M, Fukami T, Yamanaka H, et al. Comprehensive evaluation of variability in nicotine metabolism and CYP2A6 polymorphic alleles in four ethnic populations. *Clin Pharmacol Ther* 2006; **80**: 282-97.
- 4) Miksys S, Lerman C, Shields PG, et al. Smoking, alcoholism and genetic polymorphisms alter CYP2B6 levels in human brain. *Neuropharmacology* 2003; **45**: 122-32.
- 5) Su Y, Han W, Giraldo C, De Li Y, Block ER. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; **19**: 819-25.
- 6) Washio I, Maeda M, Azuma J, et al. Cigarette smoke extract induces CYP2B6 through constitutive androstane receptor in hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2011; **39**: 1-3.
- 7) Becker TC, Noel RJ, Coats WS, Gómez-Foix AM, Alam T, Gerard RD, Newgard CB. Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells, in *Methods in Cell Biology* 1994: 161-189, Academic Press, New York.
- 8) 中島 美紀. 喫煙とCYP2A6の遺伝子多型. *医学のあゆみ* 2002; **201**: 675-81.
- 9) Pidoplichko VI, DeBiasi M, Williams JT, Dani JA. Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* 1997; **390**: 401-4.
- 10) Wooltorton JR, Pidoplichko VI, Broide RS, Dani JA. Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J Neurosci* 2003; **23**: 3176-85.
- 11) Rose JE, Corrigan WA. Nicotine self-administration in animals and humans: similarities and differences. *Psychopharmacology (Berl.)* 1997; **130**: 28-40.
- 12) Marubio LM, Gardier AM, Durier S, et al. Effects of nicotine in the dopaminergic system of mice lacking the $\alpha 4$ subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Eur J Neurosci* 2003; **17**: 1329-37.
- 13) Yamazaki H, Inoue K, Hashimoto M, et al. Roles of CYP2A6 and CYP2B6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *Arch Toxicol* 1999; **73**: 65-70.
- 14) Al Koudsi N, Tyndale RF. Hepatic CYP2B6 is altered by genetic, physiologic, and environmental factors but plays little role in nicotine metabolism. *Xenobiotica* 2010; **40**: 381-92.

