

| | |
|---------------|--|
| 氏 名 | 三 村 由 卯 |
| 学 位 の 種 類 | 博 士 (医 学) |
| 学 位 記 番 号 | 博 士 第 6 6 1 号 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 2 4 年 3 月 9 日 |
| 学 位 論 文 題 目 | Effect of Common Exon Variant (p. P364L) on Drug Glucuronidation by the Human UDP-glucuronosyltransferase 1 Family (UDP-グルクロン酸転移酵素 1 型ファミリー共通エクソン変異 (p. P364L) が薬剤代謝に及ぼす影響) |
| 審 査 委 員 | 主 査 教 授 前 川 聡 副 査 教 授 岡 村 富 夫 副 査 教 授 岡 田 裕 作 |

論文内容要旨

| | | | |
|--------|--|--------------|---------------|
| ※整理番号 | 666 | (ふりがな) 氏名 | みむらゆう 三村由卯 |
| 学位論文題目 | <p>Effect of Common Exon Variant (p.P364L) on Drug Glucuronidation by the Human UDP-Glucuronosyltransferase 1 Family</p> <p>(UDPグルクロン酸転移酵素1型ファミリー共通エクソン変異 (p. P364L) が薬剤代謝に及ぼす影響)</p> | | |
| 研究目的 | <p>UDP グルクロン酸転移酵素(以下 UGTs と略す)は膨大な数の生体内物質の代謝や薬剤の解毒を担う重要な酵素である。この酵素の活性が下がる(または上がる)ことにより薬物や生体内物質などの血中濃度に変化をきたす可能性がありこれまで UGT1A ファミリー、特に UGT1A1 のエクソン1の遺伝子多型と薬剤の副作用や発がんリスクとの関係が数多く議論、報告されてきた。UGTs は UGT1 と UGT2 の二つのサブファミリーに分かれている。UGT1 は可変エクソンであるエクソン1と共通エクソンであるエクソン2~4 から成り、エクソン1を切りかえることによって UGT1A1~1A10 までのアイソフォームが作られ、アイソフォームによって対応する基質が異なっている。エクソン1の多型によりある一つのアイソフォームの代謝活性に変化がたととしても、多くの基質は複数のアイソフォームに重複して代謝されるため薬剤代謝において臨床的影響に直結しない可能性がある。そこで今回私たちは共通エクソンに存在する p. P364L に注目した。p. P364L は共通エクソンであるエクソン4に存在するため、その人の持っている UGT1A ファミリーの全てのアイソフォームで影響を及ぼす可能性が高い。この共通エクソン変異 p. P364L の影響を明らかにするため p. P364L の健康日本人における遺伝子頻度を調べ、薬剤代謝に及ぼす影響を検討した。</p> | | |
| 方法 | <p>①多型解析</p> <p>滋賀医大倫理委員会による承認を受け、健康ボランティア 187 名の末梢血よりゲノムを抽出後、PCR 法によりエクソン 2~4 の部位を増幅しダイレクトシーケンスにより塩基配列を確認した。</p> <p>②発現ベクターの作成</p> <p>各 UGT アイソフォームが発現している臓器の cDNA ライブラリを購入し、PCR にて増幅後 TOPO XL ベクターにライゲーションした。大腸菌を用いてプラスミドを増やし p. CR3.1 ベクターにサブクローニングした。Mutanexpress Km kit を使い、p. P364L 変異を導入した</p> <p>③発現実験</p> <p>作製した全アイソフォームのベクター (wild type, p. P364L) をリポフェクション法を用いて cos7 細胞にトランスフェクションした。細胞ホモジネートに基質 (17β estradiol, acetaminophene, propofol, lamotrigine, imipramine, cyproheptadine)、UDP グルクロン酸、バッファーを加えて 37℃ で反応させ 17β estradiol と acetaminophene については HPLC で分析した。propofol, lamotrigine, imipramine, cyproheptadine については ¹⁴C グルクロン酸を用い、薄層クロマトグラフィーで展開し</p> | | |

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

Instant imager でグルクロン酸抱合体量をカウントして酵素活性を測定した。

④ウェスタンブロッティング

各発現実験に用いた細胞ホモジネートを SDS-polyacrylamide で電気泳動し、PVDF membrane に転写し、ブロッキング後、抗 UGT1A 抗体 (1 次抗体)、抗ウサギ IgG 抗体 (二次抗体) と反応後発行させた。Image Master-CL により測定して各反応間の酵素量を補正した。

結果

①多型解析

187 名中 2 名に hetero の変異が見つかり、健康日本人におけるアレル頻度は 0.0053 であった。

②p. P364L の酵素活性への影響

p. P364L-UGT1A1, 1A3, 1A7, 1A8, および 1A10 の 17 β estradiol に対する Vmax はそれぞれに対応する wild type-UGT1A の 36.6%, 82.1%, 26.8%, 29.2%, および 22.5% に低下した。acetaminophene に対しては p. P364L-UGT1A1, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, および 1A10 の 20mM における反応速度はそれぞれに対応する wild type-UGT1A の 50.3%, 46.4%, 17.2%, 44.1%, 5.0%, および 42.8% と低下した。propofol に対しては p. P364L-UGT1A7, 1A8, 1A9, および 1A10 の 20mM における反応速度はそれぞれに対応する wild type-UGT1A の 44.0%, 49.8%, 29.0%, および 71.1% に低下した。lamotrigine に対しては、p. P364L-UGT1A4 の 750 μ M における反応速度は wild type の 35.5% に低下した。また、wild type-UGT1A4 で見られていた基質阻害が p. P364L-UGT1A4 では消失しており、UGT1A4 で代謝される imipramine, cyproheptadine でも同様の現象が認められた。

考察

今回使用した基質はいずれも全世界で広く一般的に使用されている薬ばかりである。これらの薬剤において p. P364L 変異は UGT1A1 だけでなく、UGT1family 全体で一斉に、かつ様々な程度で酵素活性を低下させることが明らかになった。遺伝子頻度が 0.0053 と日本人で比較的頻度の高い変異であるということも明らかとなり、薬剤の副作用や発がんのリスクに影響を与える可能性が高く重要な変異だと考えられた。現時点で UGT1s の蛋白立体構造は解明されていない。コンピュータによる UGT1A6 における p. P364L の立体構造予測でこの変異が UDP グルクロン酸への結合部位を変化させ結合を弱める可能性があるとの報告があるが、今回の研究により実際に UGT1s 全体で酵素活性が低下することに加え、エクソン 2~4 は共通の配列であるにもかかわらずアイソフォームや基質によって低下の程度が様々であることや UGT1A4 では基質阻害が解除されることも判明した。これらの結果より p. P364L は UDP グルクロン酸結合部位のみならずアイソフォームによって構造の違う基質結合部位の立体構造にも影響を及ぼしている可能性が高いと考えられた。

結論

p. P364L は日本人において遺伝子頻度が 0.0053 と比較的頻度の高い変異であった。

p. P364L は全てのアイソフォームで一斉に、そして様々な程度で酵素活性の低下を招いた。UGT1A ファミリーは非常に多くの薬剤、内因性ホルモン、植物性フラボノイドや発がん物質などを代謝しており、p. P364L は副作用や疾病の発現を考えるにあたり重要な変異である。

さらにこの結果は共通エクソンに存在する変異の重要性をも示している。個々の患者の遺伝的特性に合った治療を実現化するには UGT1 共通エクソンを含めて薬剤代謝に関わる全てのアイソフォームを総合して検討し臨床と関連した更なる研究を行うことが必要である。

学位論文審査の結果の要旨

| | | | |
|---|-----|----|-------|
| 整理番号 | 666 | 氏名 | 三村 由卯 |
| 論文審査委員 | | | |
| <p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>UDP グルクロン酸転移酵素 1 型(UGT1)は薬剤代謝の第 2 相を担う重要な酵素であり、9 つの可変エクソン 1 と共通エクソン 2～5 からなる。今回 共通エクソン 4 に存在する P364L 変異に注目し、その遺伝子頻度と薬剤代謝における UGT1 活性に与える影響を検討し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 日本人において P364L 変異は遺伝子頻度 0.0053 で、頻度の高い変異であった。 2) 17β-estradiol, acetaminophene, propofol, lamotrigine の代謝において、P364L 変異は UGT1 の各アイソフォームの酵素活性を様々な程度に低下させた。 3) lamotrigine, cyproheptadine, imipramine の代謝において、UGT1A4 の野生型で認められる基質阻害が、P364L 変異で解除された。 <p>以上の結果より、共通エクソンに存在する変異は UGT1 の全てのアイソフォーム活性に影響を与える可能性が高く、薬剤代謝に与える遺伝子変異の影響を検討する際には、共通エクソンを含め全てのアイソフォームについて検討する必要があることが示唆された。</p> <p>本論文は、UDP グルクロン酸転移酵素の共通エクソンの遺伝子変異が薬剤代謝に与える影響の重要性について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 597 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 24 年 1 月 30 日)</p> | | | |

最終試験の結果の要旨

| | | | |
|--|-----|----|-------|
| 整理番号 | 666 | 氏名 | 三村 由卯 |
| 論文審査委員 | | | |
| <p>(最終試験の結果の要旨)</p> <p>最終試験において以下の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none">1. アイソフォームによって V_{max} が変化するものと K_m が変化するものがあることについて2. P364L ヘテロ変異を有する症例の表現型について3. ウェスタンブロットに用いた抗体の認識する UGT1A のエピトープについて4. UGT1 の遺伝子頻度の人種差について5. 消化管に UGT1 が発現している意義について6. 環境因子による UGT1 の発現調節について7. UGT1A に多くのアイソフォームが存在する理由について8. UGT1A4 の基質の結合形式について、また、基質の構造の共通性について9. UGT1 の SNP マーカーについて10. 共通エクソンの変異が少ないことについて11. 発癌リスクについて <p>上記いずれの質問に対しても的確な解答が得られた。</p> <p style="text-align: right;">(平成 24 年 1 月 30 日)</p> | | | |