11S1-04 CYP2D6ならびにCYP2E1遺伝子多型と肝ミクロゾーム薬物酸化活性との関係 —日本人39例、欧米人45例における解析—

○島田 力¹⁾、津村 富士子¹⁾、山崎 浩史^{1,2)}、
F. Peter Guengerich³⁾、井上 清¹⁾

¹⁾大阪府公衛研、²⁾(現)金沢大・薬、³⁾Vanderbilt大・医

RELATIONSHIPS BETWEEN GENETIC POLYMORPHISMS IN CYP2D6
AND CYP2E1 GENES AND LIVER MICROSOMAL DRUG OXIDATION
ACTIVITIES—STUDIES WITH 39 JAPANESE AND 45 CAUCASIANS—

Tsutomu SHIMADA,¹⁾ Fujiko TSUMURA,¹⁾ Hiroshi YAMAZAKI,^{1,2)}
F. Peter GUENGERICH,³⁾ and Kiyoshi INOUE¹⁾

¹⁾Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka 537-0025,

²⁾Kanazawa University, Takara-machi, Kanazawa 920-0934, and

³⁾Vanderbilt University, Nashville, TN37232

【目的】ヒトの肝ミクロゾーム中には10種類以上の薬物代謝型チトクロームP450 (P450あるいはCYP) が存在し、各酵素は基質特異性をもって、多数の薬物・毒物・発癌性物質などの外来性物質やステロイドなどの内因性物質の酸化的代謝に関わっている。各P450の含量・活性には個人差があり、代謝の亢進あるいは減弱によって薬理効果・副作用・毒性発現の感受性に差があらわれる。P450の変動は、大きく環境要因と遺伝的要因によることが知られている。前者は、P450の誘導・阻害物質による含量の増大・活性の低下が、後者では遺伝的多型によるP450の欠損あるいは活性の減弱、あるいは発現調節領域での変異によるP450量の変動が知られている。このようなP450の量・活性の個人差は、臨床における薬物の有効な使用、副作用や薬物相互作用の回避、薬物毒性や癌感受性の違い、などに関連するものと注目されている。今回我々はP450の遺伝的多型の問題についてCYP2D6とCYP2E1を取り上げ、日本人と欧米人での多型の頻度を調べ、そのうえで、変異によってもたらされるそれぞれの酵素の活性の変動を、肝ミクロゾーム薬物酸化活性を測定することで調べ、比較検討したので報告する。

【方法】日本人39例、欧米人45例の肝臓からDNAを調整しCYP2D6とCYP2E1遺伝子多型を検出した。前者では21種類の後者では4種類の変異を測定した。同時に得た肝ミクロゾームを用いて薬物酸化活性を測定し、それぞれのP450の遺伝子多型によってもたらされる活性の変動を解析

した。P450による薬物の酸化活性は、CYP2D6についてはブフラロールを基質とし、CYP2E1については7-エトキシクマリン、クロルゾキサゾンを用いてHPLC法で調べた。肝ミクロゾーム中のP450分子種の量は、ウエスタンブロッティング法で調べた。CYP2D6については市販のモノクローナル抗体をCYP2E1についてはヒト肝より精製した蛋白に対するポリクローナル抗体を用いた。発現系酵素は、ヒトのP450遺伝子を導入した大腸菌、昆虫細胞から得たものを用いた。

【結果・考察】CYP2D6遺伝子多型の頻度の人種差：日本人本人39例、欧米人45例の肝臓からDNAを調整し21種のCYP2D6遺伝子多型を調べた。今回の我々のサンプルから11種類のCYP2D6遺伝子の変異が検出された。変異の頻度をみると日本人では*10B (*10Aは検出されなかった) が34.6%と最も高く、次いで*2Aが12.8%であった。欧米人では*2Aが29.5%、*4A、*4D、*4E、*4Lがそれぞれ6.8%、3.4%、4.5%、9.1%であった。*2E、*3A、*9が低い頻度で検出された。それぞれの変異の組み合わせにより日本人では7つの型に、欧米人では13の型に分類された。このうち日本人で*10B/*10Bのサンプルを7例、欧米人で*4/*4のサンプルを5例認めた。

肝ミクロゾームCYP2D6含量とブフラロール1'-水酸化活性：CYP2D6遺伝子多型を検出した肝臓を材料としてミクロゾームを調整し、CYP2D6含量を免疫学的に、指標活性であるブフラロール1'-水酸化活性をHPLCで調べ比較した。

Fig. 1. Immunoblot analysis of liver microsomes of humans genotyped for CYP2D6 gene. Liver microsomal proteins (20 μ g) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and protein bands were determined with anti-CYP2D6. The genotypes of CYP2D6 in these individuals (from A to Q) are *1/*1, *1/*2, *1/*4D, *1/*4L, *1/*9, *1/*10B, *S1/*10B, *2/*2, *2/*4D, *2/*10B, *3/*3, *4A/*4A, *4A/*4L, *4D/*4L, *4L/*9, *10B/*10B, and *4E/*M12.

ミクロゾーム中のCYP2D6蛋白は遺伝子型で*4/*4をもったサンプル以外は全て検出された (Fig. 1)。興味深いことは、*3/*3をもった欧米人のサンプルでは泳動上易動度の異なる位置に強いバンドを検出したことと、*10B/*10Bをもった日本人7例ではCYP2D6含量が*1や*2のサンプルに比べ低下していた点である。CYP2D6含量とブフラロール酸化活性との相関関係は、日本人だけのサンプルを用いると $r=0.88$ 、欧米人だけでは $r=0.85$ 、両人種を合わせてみると $r=0.88$ であった。

CYP2D6遺伝子多型による活性変動：日本人でみられた*10B/*10Bにおいては、CYP2D6蛋白の発現低下だけでなくブフラロール1'-水酸化活性の低下も観察された。これは V_{max}/K_m の低値として認められた。*10Bのヘテロの遺伝子型においても活性低下を示すサンプルがあった。一方、欧米人にみられた*4/*4のサンプルでもやはり活性低下があり、これらのサンプルではキニジンによる阻害は観察されず、 α -ナフトフラボンによる阻害、すなわちこれらの個体ではCYP1A2がかわって活性に関わっていることが明らかとなった。*3/*3の個体においても著しい活性低下を認めた。

CYP2E1遺伝子多型の人種差と肝ミクロゾーム薬物酸化活性の変動：日本人と欧米人の肝DNAを用いてCYP2E1の3種類の多型 (RsaI/FstI, DraI, MspIによる検出) を調べた。多型の組み合わせにより日本人では7つの遺伝子型に、欧米人では4つの型に分類された。CYP2E1蛋白質の発現量ならびに7-エトキシコマリノ、クロルゾキサゾンを基質として調べたミクロゾームの活性の結果から、このような遺伝子型による大きな影響は観察されなかった。

以上、CYP2D6とCYP2E1遺伝子多型と肝ミクロゾーム薬物酸化活性との関係を調べた結果を報告した。SNPがもたらす影響について今後とも基礎的研究の蓄積が望まれるものと考えます。

【ABSTRACT】 Twenty one types of genetic polymorphisms in CYP2D6 gene were determined in liver DNA of Japanese and Caucasians and compared these CYP2D6 genotypes with CYP2D6 protein levels and bufuralol 1'- and 6-hydroxylation activities in liver microsomes of these human samples. We detected 11 types of CYP2D6 genetic polymorphisms and classified these humans into 17 genotypes; 7 types were found in the Japanese and 13 types in the Caucasian. CYP2D6*10B, but not CYP2D6*10A, was the most frequent in mutation at 34.6% in the Japanese, whereas in Caucasians, CYP2D6 polymorphisms including CYP2D6*4A, *4D, *4E, *4L *3, *9, and *M12 (frequencies at 6.8, 3.4, 4.5, 9.1, 2.3, 2.3, 4.5%) respectively, were detected. A Caucasian having homozygous CYP2D6*3/*3 had a protein with slower gel mobility (immunoblotting with anti-CYP2D6 antibody) and a very low activity for bufuralol 1'-hydroxylation. Five Caucasian samples with CYP2D6*4A/*4A, *4A/*4L, or *4D/*4L had no measurable CYP2D6 protein and very low bufuralol 1'-hydroxylation activities. Seven Japanese subjects with CYP2D6*10B/*10B had CYP2D6 protein at levels of ~20% of those present in humans with CYP2D6*1 and *2 and catalyzed bufuralol 1'-hydroxylation at low rates. These results support the view that CYP2D6*3, *4A, *4D, and *4L are major genotypes in producing poor metabolizer phenotypes in CYP2D6 in Caucasians, whereas CYP2D6*10B is a major causes in decreasing CYP2D6 protein expression and catalytic activities in Japanese. We also determine three types of CYP2E1 genetic polymorphisms, namely RsaI/PstI-, DraI-, and MspI-types, and compared these genotypes with levels of CYP2E1 and activities of 7-ethoxycoumarin O-deethylation and chlorzoxazone 6-hydroxylation in liver microsomes from these human samples. The results obtained collectively indicated that RsaI/PstI-, DraI-, and MspI-types of CYP2E1 polymorphisms may not cause significant alterations in protein expression and enzyme catalytic activities of CYP2E1 enzyme in human livers.