第20回 日本臨床薬理学会年会 1999年12月3~4日 横浜

CYP2D6*10 遺伝子多型の血中濃度に及ぼす影響を *in vitro* で予測できるか？

福田 剛 史*¹ 西田 裕 子*¹ 今 岡 進*²
廣 井 豊 子*² 猶 原 雅 和*¹ 船 江 良 彦*²
東 純 一*¹

目的： CYP2D6 には遺伝子多型が存在し、CYP2D6 の基質薬物の血中濃度の個人差に影響していることが示されてきた。我々は Extensive Metabolizer (EM) 群内の変異ではあるが、日本人に多く存在する CYP2D6*10 変異^{1,2)}に着目し、CYP2D6 で代謝される³⁾ 新規抗うつ薬 venlafaxine の未変化体および代謝物の血中濃度の個人間でのバラツキを、CYP2D6*10 (*10) の遺伝子型により説明した⁴⁾。その後、さらに主代謝酵素が CYP2D6 であるカルシウム受容体アゴニスト KRN 568 の臨床試験から、CYP2D6*10 遺伝子多型の関与を報告した。2剤の結果を比較検討することにより、*10 遺伝子多型の血中動態に対する影響が基質薬物によって異なる可能性を示した。

今回、我々は CYP2D6*10 型の影響を *in vitro* で予測可能かを検討するため、野生型の CYP2D6*1 と2つのアミノ酸変異 (Pro34→Ser, Ser468→Thr) を持つ CYP2D6*10 (*10A) 型の変異酵素を酵母に発現させ、代謝能の特性を検討した。

方法： CYP2D6*10 型遺伝子を持つと遺伝子判定された被験者のリンパ球から CYP2D6*10B cDNA (発現する酵素は CYP2D6*10A と命名⁵⁾) および CYP2D6*10C (*10B の配列+exon9 の13塩基変異) の exon9 の変異部位の配列をもつ cDNA を得た。CYP2D6*1 (*1, wild) および CYP2D6*10A (*10A)、CYP2D6*10C (*10C) を NADPH-P450 reductase と共に酵母に発現させ、常法に従いミクロソームを調整した⁶⁾。CYP2D6 の発現は抗 CYP2D 抗体を用いて Western blotting を行い確認した。P450 量は CO 差スペクトルを測定し算出した。また、代謝活性に関しては標準的な CYP2D6 基質薬物 bufuralol および venlafaxine の発現酵素に対する Km、Vmax の算出を行った。

結果： Western blotting により CYP2D6 が発現していることが示された。*10A、*10C の発現酵素では、*1 に比べ CYP2D6 蛋白が低発現であった。また、*10A、*10C では CO 差スペクトルの 450nm 吸収が *1 に比べ有意に低く、CO 差スペクトルから計算される P450 量はミクロソーム蛋白あたりで、約 10 倍の差が見られた。

*¹ 大阪大学大学院薬学研究科臨床薬効解析学
〒565-0871 吹田市山田丘 1-6

*² 大阪市立大学医学部生体化学

Table Kinetic parameters of CYP2D6 variants

CYP2D6 variants	Content	bufuralol 1'-hydroxylation		venlafaxine O-demethylation	
		Km	Vmax	Km	Vmax
CYP2D6*1	83.1	1.6	13.9	8.8	1.4
CYP2D6*10A	4.5	8.6	15.8	51.9	3.7
CYP2D6*10C	5.4	55.6	12.3	117.4	1.5

Vmax: nmol/min/nmol P450 Km: μ M
Content: pmol P450/mg microsomal protein

代謝活性に関する検討では、bufuralol に対する *10A の Km は *1 に比べやや高値を示した。一方、venlafaxine に対しても、*10 の Km が *1 に比べ高値を示した。逆に P450 nmol あたりの Vmax に関しては両薬物とも *10A の方がやや高値を示した。しかし、クリアランスの指標として Vmax/Km を算出し酵素間で比較すると、*1 > *10A > *10C の順であった。発現量も考慮し、ミクロソーム蛋白で補正すると *10A の Vmax/Km は *1 に比べ著しく高値を示した。

考察: Johansson²⁾らは、COS 細胞に CYP2D6*10 の遺伝子を導入し *10A (Ch1)、*10C(Ch2)を発現させており、細胞蛋白あたりの bufuralol 活性を測定し、*1 に比べ *10A での代謝の低下していることを認め、*10A 蛋白が不安定であろうと述べている。また、Yamazaki らは N-末端の Proline リッチな領域が P450 で広く保存されており、安定性に重要であることを報告している⁷⁾。*10 変異ではこの Proline リッチな領域の初めの Proline が Serine に変換した変異があり、安定性の低下が考えられる。今回の結果も、*10 の発現量が *1 に比べて低く、不安定である本酵素の性質を示唆するものである。さらに、今回は薬物の親和性に関する検討を加え、*10 では Km が上昇することを示した。

以上のことから、我々が報告した *10 型をホモで保有する者における venlafaxine の血中濃度の上昇は、*10 酵素が低発現かつ不安定であるだけでなく、venlafaxine に対する Km の上昇も一因であると考えられた。

我々は、*10 型遺伝子の保有者におけるヒト血中濃度に及ぼす影響が CYP2D6 の基質薬物間で異なることを観察しており、また今回は *in vitro* でも 2 種の薬物に対する *10 発現酵素の影響が異なる結果を得た。*10 酵素の親和性に関する報告は初めてであり、この *in vitro* の成績が、*in vivo* における *10 型のヒト血中濃度への影響を予測する指標となることが示唆される。

今後、さらに各種 2D6 の基質薬物について *10 発現酵素による *in vitro* 代謝実験を行い、ヒト *in vivo* 薬物動態試験の結果と比較検討することが必要である。

参考文献

- 1) Yokota, H. et al. Pharmacogenetics 3: 256-63, 1993.;
- 2) Johansson, I. et al. Mol Pharmacol 46: 452-9, 1994.;
- 3) Otton, S. V. et al. Br J Clin Pharmacol 41: 149-156, 1996.;
- 4) Fukuda, T. et al. Br J Clin Pharmacol 47: 450-3, 1999.;
- 5) Daly, A. K. et al. Pharmacogenetics, 6(3), 193-201.
- 6) Wan, J. et al. Arch. Biochem. Biophys. 348: 383-90, 1997.;
- 7) Yamazaki, S. et al. J Biochem Tokyo 114: 652-7, 1993.;