

論文内容要旨

アセトアミノフェンによる

Cytochrome P450 タンパク質の分解制御に関する研究

主指導教員：太田 茂 教授

(応用生命科学部門 生体機能分子動態学)

副指導教員：小澤 孝一郎 教授

(応用生命科学部門 治療薬効学)

副指導教員：佐能 正剛 助教

(応用生命科学部門 生体機能分子動態学)

山頭 征岳

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

アセトアミノフェンによる Cytochrome P450 タンパク質の分解制御に関する研究

【序論】

Cytochrome P450 (CYP) は医薬品や生体内物質の代謝を担う重要な酵素の一つである。その中でもヒトにおいて主要な分子種である CYP3A4 は医薬品の代謝に大きく寄与しており、その代謝活性の変動に伴う薬理活性の増強や減弱、または毒性の増強を考慮に入れると、基質となる医薬品やその他の化学物質による発現制御メカニズムを理解することは重要である。CYP3A サブファミリーは化学物質により核内受容体の活性化を介して、転写活性化され、酵素誘導されるという報告が多く、mRNA 発現量と代謝活性の間に良好な相関を有することが明らかにされている (Richert *et al.*, 2009)。しかし、解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェン (APAP) はマウスにおいて CYP3A11 mRNA 発現量を変化させることなく CYP3A タンパク質の発現量を上昇させること (Wolf *et al.*, 2005) やラットにおいて CYP3A の代謝活性を上昇させること (Kim *et al.*, 2007) から、転写活性化のみならず、タンパク質の分解を抑制することで代謝活性を上昇させる可能性があるという仮説を立てた。

そこで本研究では APAP がラット肝臓で発現している CYP3A1/23 タンパク質の分解に及ぼす影響とそのメカニズムについて薬物代謝酵素の発現量を安定的に維持できることが期待されるスフェロイド培養系を用いて検討した。

【結果・考察】

1. 肝細胞スフェロイド培養系における CYP3A1/23 タンパク質の安定性

当研究室では本スフェロイド培養系において CYP3A1/23 mRNA 発現量が安定的に維持できることをすでに報告している (Sanoh *et al.*, 2014)。そこで CYP3A1/23 タンパク質発現量を評価したところ、培養 5 日目から 9 日目まで維持されていることが確認された。

2. APAP が CYP3A1/23 に及ぼす影響

APAP (1, 10 mM), 24 時間曝露により、CYP3A1/23 タンパク質発現量は上昇し、代謝活性も濃度依存的に上昇した。しかし、CYP3A1/23 mRNA 発現量は曝露後 2, 6, 12, 18, 24 時間において変化は認められなかった。

3. APAP が CYP3A1/23 タンパク質の分解に及ぼす影響

APAP により mRNA 発現量に依存しないタンパク質発現量の上昇が確認されたことから、タンパク質半減期を APAP が延長していると考えた。スフェロイドにタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) と APAP を曝露したところ、CHX 単独では時間依存的にタンパク質の減少が確認され、タンパク質半減期はおおよそ 11 時間であったが、APAP (10 mM) を併用曝露すると、タンパク質の減少が確認されず半減期の延長が認められたことから、APAP はタンパク質の分解を抑制している可能性が示唆された。

4. APAP がプロテアソーム活性に及ぼす影響

CYP3A タンパク質はユビキチンプロテアソーム系により分解されることが明らかにされて

いることから (Correia, 2003)、APAP がプロテアソーム活性に及ぼす影響を評価した。APAP (10 mM) によりポジティブコントロールである MG132 と比較して緩やかな活性の低下が認められたが、APAP によりポリユビキチン化されたタンパク質の発現量の蓄積は確認されなかったことから、APAP がプロテアソームの活性を低下させることで非特異的に CYP3A タンパク質の分解を抑制している可能性は低いことが示唆された。

5. APAP が CYP3A1/23 のユビキチン化に及ぼす影響

次に APAP が CYP3A1/23 のユビキチン化に及ぼす影響を免疫沈降および western blotting を用いて評価した。APAP は CYP3A1/23 のポリユビキチン化を阻害していることが示唆されたことから、CYP3A をユビキチン化するタンパク質である E3 リガーゼの発現量に着目し、検討を行った。CYP3A の E3 リガーゼとして glycoprotein 78 (gp78) が近年同定されており (Kim *et al.*, 2010)、gp78 タンパク質発現量を評価したところ、APAP (10 mM) によりタンパク質発現量が有意に減少していることが確認された。

【総括】

本研究により APAP は CYP3A のポリユビキチン化を阻害し、タンパク質の分解を抑制することで、代謝活性を上昇させることを明らかにした。APAP は CYP3A により反応性代謝物を生成し、肝障害を引き起こすことが知られており、この代謝活性の上昇は毒性の増強に寄与している可能性がある。これまでに医薬品が CYP3A タンパク質の分解を抑制することで代謝活性を上昇させるメカニズムを明らかにした報告はなく、このような化学物質が APAP 以外にも明らかにされれば、新しい概念の薬物間相互作用として臨床において注意が必要となる可能性が考えられる。

【基礎となる原著論文】

Masataka Santoh, Seigo Sanoh, Masashi Takagi, Yoko Ejiri, Yaichiro Kotake, Shigeru Ohta
Acetaminophen induces accumulation of functional rat CYP3A via polyubiquitination
dysfunction. *Scientific Reports*, 6, 21373; doi: 10.1038/srep21373, 2016.