

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（薬学）	氏名	山頭 征岳
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
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			
論文審査担当者			
主査	教授	高野 幹久	印
審査委員	教授	森岡 徳光	
審査委員	准教授	細井 徹	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>Cytochrome P450 (CYP) は医薬品や生体内物質の代謝に関わる重要な酵素であり、中でも CYP3A サブファミリーは現在承認されている医薬品の代謝において高い寄与を示すことが報告されている。そのため、代謝活性の変動に伴う医薬品の毒性の増強や薬理活性の増減などを考えると、基質となる医薬品やその他の化学物質による CYP3A の発現制御メカニズムを理解することは重要である。CYP3A は化学物質により核内受容体の活性化を介して、転写が促進され、酵素誘導されることが広く知られており、mRNA 発現量と酵素活性には良好な相関があることが報告されている。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 <i>in vivo</i> において mRNA 発現量を上昇させることなく CYP3A タンパク質発現量を上昇させることや、ラット <i>in vivo</i> において CYP3A 酵素活性を上昇させることが報告されており、タンパク質の分解抑制により酵素活性を上昇させる可能性が考えられるものの、酵素誘導における統一的な理解が得られていないのが現状である。そこで本研究では、薬物代謝酵素の発現量が安定的に維持できることが期待されている三次元培養系を用いてラット初代肝細胞スフェロイドを形成し、APAP が CYP3A1/23 タンパク質の分解系に及ぼす影響を <i>in vitro</i> において評価することを目的とした。</p> <p>APAP (1, 10 mM) 曝露により従来の報告と同様に酵素活性とタンパク質発現量の上昇が認められた。しかし、CYP3A1/23 mRNA 発現量の上昇は APAP (1, 10 mM) 曝露により認められなかった。次に APAP が CYP3A1/23 タンパク質の分解に及ぼす影響をタンパク質翻訳阻害剤である cycloheximide (CHX) を用いて検討した。CHX 単独曝露では時間依存的な CYP3A1/23 タンパク質の減少が認められたが、APAP (1, 10 mM) を併用することでその減少が抑制されたことから、APAP は CYP3A1/23 タンパク質の分解を抑制していることが示された。CYP3A1/23 タンパク質はユビキチンプロテアソーム系と呼ばれるタンパク質分解機構により分解されることから、APAP がタンパク質の分解を担うプロテアソームに及ぼす影響を評価したが、タンパク質の分解抑制に起因する結果は APAP (1, 10 mM) 曝露により認められなかった。次に、タンパク質を分解する際にその目印としての役割を果たす、ユビキチンと呼ばれるタンパク質を CYP3A1/23 タンパク質に付加する過程に APAP が及ぼす影響を評価した。APAP は濃度依存的にポリユビキチン化された CYP3A1/23 タンパク質発現量を減少させ、さらに APAP (10 mM) 曝露により CYP3A1/23 タンパク質にユビキチンを付加する酵素である glycoprotein 78 のタンパク質発現量の有意な減少が認められた。</p> <p>APAP は CYP により代謝活性化を受けて活性代謝物である N-acetyl-<i>p</i>-benzoquinone imine (NAPQI) を生成することが知られており、過剰な NAPQI は細胞内グルタチオンを減少させ、細胞内タンパク質と結合し、活性酸素種や肝障害を引き起こすことが報告さ</p>			

れている。そこで APAP による CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制作用における APAP, NAPQI, 及び NAPQI の生成に伴う活性酸素種の寄与を非選択的 CYP 阻害剤である 1-aminobenzotriazole (ABT) や N-acetyl-L-cysteine (NAC) を併用して検討した。ABT との併用曝露下では APAP により減少した gp78 タンパク質発現量に対する影響は認められず、また APAP により減少したポリユビキチン化された CYP3A1/23 タンパク質発現量に対する影響も認められなかった。次に、NAC との併用曝露を検討したが、APAP により発現量が上昇した CYP3A1/23 タンパク質発現量に対する影響は認められなかった。ゆえに、APAP による CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制作用は NAPQI や活性酸素種ではなく、APAP 自身に起因することが示唆された。

最後に、APAP の構造類縁体を用いて CYP3A1/23 mRNA, タンパク質発現量、CYP3A 酵素活性に及ぼす影響を評価した。候補化合物として APAP の位置異性体である N-acetyl-*m*-aminophenol (AMAP), N-acetyl-*o*-aminophenol (AOAP) と APAP の水酸基がカルボキシ基に置換された *p*-Acetamidobenzoic acid (PacBA) の 3 種類を選択した。AMAP (10 mM) 曝露により CYP3A1/23 タンパク質発現量と CYP3A 酵素活性の有意な上昇が認められたが、APAP と同様に CYP3A1/23 mRNA 発現量の上昇は認められなかった。一方、PacBA (10 mM) 曝露により CYP3A1/23 mRNA, タンパク質発現量及び CYP3A 酵素活性の有意な減少が認められた。ゆえに、APAP のみならず位置異性体である AMAP においても CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制作用を有している可能性が示唆された。

以上の結果から、本論文は APAP が転写活性化ではなくタンパク質の分解を抑制することで CYP3A1/23 タンパク質発現量を上昇させ、酵素活性を上昇させることを初めて明らかにした。また、APAP のみならずその位置異性体である AMAP も同様の分解抑制作用を有している可能性があり、さらに構造類縁体である PacBA では分解抑制作用が認められなかったことから、特異的な化学構造がその分解抑制作用に起因している可能性がある。今後、化学構造に着目しながら同様の分解抑制作用を有する化学物質を明らかにし、CYP3A1/23 タンパク質の分解抑制を引き起こす詳細なメカニズムを解明することによって、従来の転写活性化を介した酵素活性の上昇とは異なる新しい概念の酵素誘導として注意が必要となると考えられる。よって、審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（薬学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。