

氏名(本籍)	伊藤 誠 紀 (滋賀県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博士第388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14年3月25日		
学位論文題目	Analysis of drug metabolic disorder using recombinant uridine di phosphate-glucuronosyltransferase (遺伝子組換えUDP-グルクロン酸転移酵素を用いた薬剤代謝障害の検討)		
	1) Effect of a conserved mutation in uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1 and 1A6 on glucuronidation of a metabolite of flutamide		
	2) Inhibitory effect of troglitazone on glucuronidation catalyzed by human uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A6		
	審査委員	主査 教授	大久保 岩 男
		副査 教授	木 村 博
		副査 教授	山 路 昭

論文内容の要旨

【目的】

近年、薬剤の副作用発現機序として薬剤代謝酵素活性の個人差や薬剤相互作用が注目されている。UDP-グルクロン酸転移酵素(以下UGT)は、薬剤代謝の第Ⅱ相反応を触媒する主要酵素である。UGTは、そのアミノ酸配列の類似性からUGT1とUGT2の二つのサブファミリーに分類され、UGT1には10種類以上のアイソフォームが存在する。UGT1遺伝子は、10個以上のエキソン1と共通エキソン(エキソン2、3、4、5)から成り立っており、各アイソフォームは、1個のエキソン1と共通エキソンのスプライシングによって決定されている。我々は、体質性黄疸(Gilbert症候群、Crigler-Najjar症候群)患者の遺伝子解析を行い、UGT1の共通エキソンに存在する変異(Y486D)を報告した。この変異を有する患者は、全てのUGT1アイソフォームが変異型となる。本研究では、重篤な肝障害が報告されている前立腺癌治療薬フルタミドの主代謝物2-アミノ-5-ニトロ-4-トリフルオロメチルフェノールと経口糖尿病薬トログリタゾンを用いて、UGT1遺伝子変異(Y486D)が薬剤代謝におよぼす影響とUGT1を介した薬剤相互作用について検討した。

【方法】

ヒト肝臓cDNAライブラリーよりPCRにてUGT1A1とUGT1A6のcDNAを増幅した。これらのcDNAをプラスミドベクターにクローニングし、塩基配列の確認後、野生型UGT1A1およびUGT1A6のベクターとした。野生型ベクターにUnique Site Elimination法を用いて変異(Y486D)を導入し、変異型ベクターとした。各々のベクターをDEAE-デキストラン法を用いてCOS7細胞に形質導入し、野生型および変異型UGT1A1、UGT1A6を発現させた。

- 発現させた各UGTとUDP-グルクロン酸、¹⁴C-UDP-グルクロン酸、MgCl₂、トリスマレイン酸、2-アミノ-5-ニトロ-4-トリフルオロメチルフェノールを混合し、37℃、15分間保温後、200 μlの氷冷エタノールを加えた。
 - 発現させたUGT1A6とUDP-グルクロン酸、¹⁴C-UDP-グルクロン酸、MgCl₂、トリスマレイン酸、1-ナフトール、トログリタゾンを混合し、37℃、15分間保温後、200 μlの氷冷エタノールを加えた。
- (1)(2)の反応後、薄層クロマトグラフィーにてグルクロン酸抱合体を分離し、Instant Imager

にて定量した。酵素反応速度論量をコンピュータープログラムを用いて求めた。

【結果】

2-アミノ-5-ニトロ-4-トリフルオロメチルフェノールは、UGT1A1とUGT1A6によってグルクロン酸抱合された。野生型UGT1A1、変異型UGT1A1、野生型UGT1A6、変異型UGT1A6の最大反応速度は、各々21.5、2.6、143、1.1以下 (pmol/min/mg) であった。野生型UGT1A1、変異型UGT1A1の2-アミノ-5-ニトロ-4-トリフルオロメチルフェノールに対するミカエリス定数は、各々337、136 (μM) であった。野生型UGT1A1、変異型UGT1A1のUDP-グルクロン酸に対するミカエリス定数は、各々332、449 (μM) であった。

トログリタゾンは、UGT1A6による1-ナフトールのグルクロン酸抱合反応を阻害した。阻害型は、混合型阻害であった。50%阻害濃度と阻害定数は、各々28、20 (μM) であった。

【考察】

UGT1の基質特異性は、エクソン1によって決定されると考えられてきた。しかし、共通エクソンの変異 (Y486D) によりUGT1A1の2-アミノ-5-ニトロ-4-トリフルオロメチルフェノールに対するミカエリス定数が変化したことおよびUDP-グルクロン酸に対するミカエリス定数が変化しないことは、共通エクソンが基質特異性に関与している可能性を示唆する。また、共通エクソンの変異は、各アイソフォームの酵素活性に同様の影響をおよぼすと考えられてきたが、Y486DはUGT1A1の活性を野生型の約10%に減少させ、UGT1A6の活性を野生型の1%以下に減少させた。これは、共通部分の変異であっても、UGT1サブファミリー全体の酵素活性におよぼす影響を推定することが困難であることを示唆する。以上より遺伝子変異 (Y486D) を持つ患者にフルタミドを投薬した場合、常用量であっても、その代謝が著しく遅延し、副作用発現に関与する可能性が考えられた。

常用量使用時のトログリタゾン肝臓中濃度は、動物実験等より9.5 μM と推定される。これは阻害定数の半分の濃度であり、トログリタゾンのUGT1A6に対する阻害作用は、临床上大きな問題にはならないと考えられたが、UGT1A6の酵素活性が低下している場合、他剤との併用には注意が必要と考えられる。

【結語】

遺伝子組換えUGTを用いた薬剤代謝の検討は、副作用発現機序を推定するうえで有用であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

薬剤性肝障害の発生機序として薬剤代謝障害が注目されている。本研究は、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) の関与する薬物代謝障害を検討したものである。野生型と変異型 (Y486D) UGT1A1とUGT1A6をデキストラン法にてCOS7細胞に発現させ、フルタミドの主代謝物FLU-3のグルクロン酸抱合を検討した。変異によりUGT1A1とUGT1A6の V_{\max} は各野生型の1/10、1/100に減少、UGT1A1のFLU-3に対する K_m は野生型の1/2に減少した。一方、トログリタゾンはUGT1A6活性に対し混合型阻害を示し、 K_i は20 μM であった。本研究はUGTの変異による薬物代謝活性低下と薬剤によるUGT活性阻害の可能性を示し、薬剤性肝障害の発生機序を考察する重要な知見を与えたもので、博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認められる。

なお、本学位授与申請者は、平成14年2月22日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。