

ニコチンの代謝とその個体差に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中嶋, 美紀 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/16231

氏名	中嶋美紀
生年月日	
本籍	秋田県
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博乙第166号
学位授与の日付	平成10年9月30日
学位授与の要件	論文博士(学位規則第4条第2項)
学位授与の題目	ニコチンの代謝とその個体差に関する研究
論文審査委員	(主査) 横井 毅 (副査) 宮本 謙一, 辻 彰, 中西 義信, 山本 郁男

学位論文要旨

Abstract

In most mammalian species, nicotine is rapidly and extensively metabolized in the liver. Nicotine is converted to cotinine by cytochrome P450 (CYP) and aldehyde oxidase, and to nicotine *N'*-oxide by flavin-containing monooxygenase (FMO). In this study, it was clarified that the same FMO isoform is responsible for the formation of *cis*- and *trans*- nicotine *N'*-oxide in rat liver; *cis*-nicotine *N'*-oxide formation was 8.1-fold greater than that of *trans*-nicotine *N'*-oxide formation. *In vitro* cotinine formation and nicotine *N'*-oxide formation did not change in galactosamine-induced hepatic rats in comparison with the controls, but significantly decreased in the thioacetamide-induced cirrhotic rats. It was suggested that the reduction of nicotine metabolism in cirrhosis was due to the decreased levels of CYP and FMO protein expression.

The enzymes involved in cotinine formation and 3'-hydroxycotinine formation in humans were identified to clarify the mechanism of large interindividual variability of nicotine metabolism. It was cleared that CYP2A6 is mainly responsible for cotinine and 3'-hydroxycotinine formation. Allelic variants have been reported in *CYP2A6* gene. As the result of phenotyping of nicotine metabolism and genotyping of *CYP2A6* gene, it was observed that one poor metabolizer had whole deletion of *CYP2A6* gene. In the current study, the relationship between interindividual variability of nicotine metabolism and *CYP2A6* genetic polymorphism was clarified.

1. 序論

主要な薬物代謝酵素であるチトクロムP450 (CYP) は薬物などの生体外異物の代謝および変異原性物質や発癌物質の代謝的活性化に関与する。CYPには複数の分子種が存在し、スーパーファミリーを形成しているが、ヒトにおいて薬物代謝に関与するのはCYP1、CYP2、CYP3、CYP4ファミリーに属する分子種である。薬物相互作用の発現機構は一般に薬力学的相互作用と薬物動態学的相互作用に分類されるが、最も頻度が高いものは

薬物動態学的相互作用の中でも CYP による代謝を介したものである。近年、多くの薬物の代謝にどの CYP 分子種が関与するかが同定され、薬物相互作用の機序解明の研究が進められてきている。

タバコの主成分であるニコチンは中枢神経系、心血管系、内分泌系に様々な作用を及ぼす。喫煙習慣の維持もニコチンに対する精神的、身体的依存による。喫煙によってニコチンは口腔粘膜、気道、肺から速やかに吸収され、体内の様々な臓器に分布するが、ほとんどは肝臓において代謝される。吸収されたニコチンの 70-90% は CYP とアルデヒドオキシダーゼによってコチニンへと代謝され、コチニンはさらに 3'-水酸化コチニンへと代謝される。もう一つのニコチンの主要代謝経路は *N*-酸化反応であり、フラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO) によってニコチン *N'*-oxide が生成する。

ヒトにおける薬物代謝酵素活性には CYP 活性に起因する大きな個体差が存在する。CYP 活性の変動をもたらす要因には薬物投与、喫煙、飲酒、食事などの外的要因と、性別、年齢、栄養状態、疾病、遺伝などの内的要因がある。その中でも個体差の程度が大きく、医薬品による副作用発現に関連するのは遺伝的要因である。本研究では受動喫煙によっても多くのヒトが摂取し得る化合物であるニコチンの代謝に及ぼす因子として、肝障害の影響と代謝酵素の遺伝的多型性について検討した。

2. ラット肝ミクロソームにおけるニコチン *N'*-oxide 光学異性体生成の速度論的解析

ニコチン *N'*-oxide には *cis* 体と *trans* 体の光学異性体が存在し、その光学異性体選択性には種差が認められている。ヒトでは *trans* 体のみが生成するが、ラットでは両異性体が生成する。ヒトにおける *trans*-ニコチン *N'*-oxide 生成には FMO3 が関与することが報告されているが、ラットにおける両異性体の生成を触媒する FMO 分子種の異同についての報告はない。また、両異性体の生成比について詳細な検討もなされていない。そこで、ラットにおけるニコチンの *N*-酸化反応の詳細を明らかにすることを目的とした。

ラット肝よりミクロソームを調製し、*in vitro* ニコチン *N'*-oxide 生成を HPLC により求めた。ラット肝ミクロソームにおける *trans*-ニコチン *N'*-oxide 生成の K_m 値は *cis*-ニコチン *N'*-oxide 生成の K_m 値の約 6.4 倍高値を示した。ラット肝ミクロソームでは *cis* 体が *trans* 体より優位に生成し、固有クリアランスは *trans* 体に比べ *cis* 体が 8.1 倍大きいことを明らかにした。*Cis*-および *trans*-ニコチン *N'*-oxide 生成はいずれもナフチルチオウレア添加またはミクロソームの 45°C 熱処理により阻害されたが、SKF-525A 添加またはミクロソームの一酸化炭素処理では影響を受けなかった。さらに、ラット肝ミクロソームにおける *cis*-ニコチン *N'*-oxide 生成と *trans*-ニコチン *N'*-oxide 生成の間に有意な相関関係が認められた。以上の結果より、ラット肝ミクロソームでは固有クリアランスの違いから *cis* 体が *trans* 体よりも優位に生成されることを明らかにした。また、*cis*-および *trans*-ニコチン *N'*-oxide 生成には同じ FMO 分子種が関与する可能性が考えられた。

3. 急性肝炎および肝硬変モデルラットにおけるニコチン代謝

肝臓は生体外異物の代謝を司る主要な臓器である。一般に肝障害時には薬物代謝能は低下すると考えられるが、CYP に着目した場合、肝障害による影響の受け方は各分子種によって異なる。また、一つの CYP 分子種でも疾患の種類によっても異なる影響を受

ける。これまで肝障害時におけるニコチン代謝の研究は行われていなかった。喫煙の有害性およびニコチンの依存性について理解するためにも肝障害時におけるニコチン代謝を理解することは重要である。ニコチンの代謝には CYP と FMO が関与するため、肝障害時におけるこれら 2 つの酵素系の変化を同時に評価できる点でも本研究は興味深い。本検討では、ヒトにおけるニコチン代謝の肝疾患による影響を検討するに先立ち、肝疾患モデルラットを作成して、肝障害時におけるニコチン代謝について検討した。

ラットにガラクトサミンまたはチオアセタミドを投与することにより、ヒトの急性肝炎および肝硬変に組織学的に類似した肝疾患を誘発させた。ニコチンからのコチニン生成およびニコチン *N'*-oxide 生成はガラクトサミン誘発急性肝炎モデルラットの肝ミクロソームでは対照群と差が認められなかったが、チオアセタミド誘発肝硬変モデルラットでは有意な減少が認められた。イムノブロット分析により肝硬変モデルラットの肝ミクロソームにおいて CYP1A2、CYP2B2、CYP2C、CYP2E1 蛋白質発現量の有意な低下が認められた。このことより、肝硬変モデルラットにおけるコチニン生成の低下はニコチンの代謝に関与する CYP2B および CYP2C 蛋白質の発現量の低下によるものであることが考えられた。また、ニコチン *N'*-oxide 生成の速度論的解析の結果、肝硬変モデルラット肝ミクロソームにおいて K_m 値は対照群と差が認められないのに対し、 V_{max} 値の有意な低下が認められた。従って、肝硬変モデルラットにおけるニコチンからのニコチン *N'*-oxide 生成能の低下は、代謝に関与する FMO 蛋白質の発現量の低下によるものであることが考えられた。このようにニコチン代謝に及ぼす影響は肝疾患によって異なることが示された。本研究により肝疾患時におけるニコチン代謝の重要な情報を提供することができた。

4. ヒト肝ミクロソームにおけるコチニン生成および 3'-水酸化コチニン生成に関与する CYP 分子種の同定

ヒトにおけるニコチンからのコチニン生成能には大きな個体差が存在することが報告されている。コチニン生成能低下と CYP2D6 遺伝的多型との関連性も報告されているが、コチニン生成を CYP2D6 が触媒するか否かも明らかにされておらず、ニコチン代謝多型の原因は不明である。ニコチンからのコチニン生成に関与する CYP 分子種は、これまでいくつかの研究グループにより報告がなされてきた。しかし、異なった *in vitro* 実験系を用い、CYP2A6、CYP2B6、CYP2D6 および CYP2E1 等の関与が報告されたが、統一した見解は得られていなかった。また 3'-水酸化コチニンについては、ヒトにおける主代謝物であるにも関わらず、その生成を触媒する酵素の同定は行われていなかった。そこで、ニコチン代謝多型の原因を明らかにすることを目的に、ニコチンの代謝に関与する酵素の同定を行った。

ヒト肝試料よりミクロソームを調製し、ニコチンからのコチニン生成およびコチニンからの 3'-水酸化コチニン生成を HPLC により測定した。ヒト肝ミクロソームにおけるコチニン生成およびコチニンからの 3'-水酸化コチニン生成は CYP2A6 蛋白量、CYP2A6 に特異的な酵素活性であるクマリン 7-水酸化酵素活性と有意に相関した。また、ヒト肝ミクロソームにおけるコチニン生成および 3'-水酸化コチニン生成は、CYP2A6 の特異的基質であるクマリンおよび抗ラット CYP2A1 抗体によって特異的に阻害された。ヒト B-リンパ芽球様細胞発現系ミクロソームにより、コチニン生成は CYP2A6 に高い活性が

認められ、3'-水酸化コチニン生成は CYP2A6 にのみ活性が認められた。以上の結果から、ヒト肝ミクロソームにおけるニコチンからのコチニン生成およびコチニンからの3'-水酸化コチニン生成はいずれも CYP2A6 によって触媒されることを明らかにした。

5. ヒトにおけるニコチンの体内動態と CYP2A6 の遺伝的多型

CYP2A6 遺伝子にはこれまで2つの変異型が報告されている。第3エクソンに1アミノ酸置換を有する CYP2A6v1 と第3、6、8 エクソンが CYP2A7 と遺伝子変換を起こした CYP2A6v2 である。しかし、これらの変異型の機能は明らかではない。また、上記2つの変異型以外にも制限酵素 SacI および SphI を用いたゲノムサザンブロット分析で多型が認められることが報告されている。そこでニコチン代謝の個体差と CYP2A6 の遺伝的多型の関連性を検討した。

6名の健常喫煙者について喫煙によるニコチンの体内動態を検討し、また CYP2A6 遺伝子の多型解析を行った。6名の被験者のうち血中コチニン濃度が低い被験者が1名認められた。この被験者は代謝能の指標であるニコチンの AUC / コチニンの AUC が他の被験者と比較して高値を示し、ニコチン代謝能が低下している可能性が示唆された。既報の方法に従い、CYP2A6v1 型および CYP2A6v2 型の判定を行ったところ、6名の被験者すべてが CYP2A6wt/CYP2A6v2 ヘテロ型であった。しかし、CYP2A7 の混入による誤判定であることがシークエンス解析から明らかになった。新規判定法を確立して判定を行ったところ、1名の被験者が CYP2A6wt のみを有し、4名が CYP2A6wt と CYP2A6v2 の両遺伝子を有していた。しかし、両遺伝子の存在比が同等ではなかったため、ヘテロ接合体とは考えられず、CYP2A6v2 遺伝子が CYP2A6 遺伝子の変異型ではなく異なる遺伝子として染色体上に存在している可能性が示唆された。また、コチニン生成能が低い1名の被験者では CYP2A6 の遺伝子断片が得られず、CYP2A6 遺伝子を欠損している可能性が考えられた。そこでゲノムサザンブロット分析を行ったところ、コチニン生成能が低い被験者は CYP2A6 遺伝子を全欠損していることを明らかにした。以上の結果より、ニコチンの代謝能が低い被験者では CYP2A6 遺伝子を欠損していることを明らかにした。従って、ニコチン代謝の個体差は CYP2A6 の遺伝的多型と関連があることが強く示唆された。

6. まとめ

本研究では、ニコチン代謝能は急性肝炎時には影響を受けないが肝硬変時に顕著に低下すること、ヒトにおけるニコチン代謝の個体差が CYP2A6 遺伝子の欠損と関連があることを明らかにした。従って、ニコチン代謝の表現型および CYP2A6 の遺伝子型の両判定により、ニコチン代謝活性の個体差に及ぼす遺伝的要因と疾患による要因が同時に評価できることが期待される。

一般的に CYP の遺伝的多型性は医薬品による副作用発現の原因となることから、薬物治療において重要な問題とされてきている。現在、臨床で使用されている薬物に CYP2A6 で特異的に代謝されるものは少ないが、新たに開発される薬物が CYP2A6 で代謝される可能性も十分ある。また、CYP2A6 は多くの変異原物質の代謝的活性化にも関与するため、個人における発癌感受性にも影響を及ぼすことも考えられる。CYP2A6 遺伝的多型の臨床的意義に関する研究の今後の展開が期待される。

学位論文審査結果の要旨

各審査委員が提出論文の審査を行い、さらに平成10年7月6日に開催された発表会での質疑応答に基づいて、その後開催された最終審査会に於いて以下の通り判定した。

ニコチンは中枢神経系、心血管系、内分泌系に様々な作用を及ぼす。喫煙により肺から吸収され、肝においてチトクロムP450 (CYP) によりコチニンへ、フラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO) によりニコチン *N'*-oxide へと代謝される。ニコチンの代謝経路とその代謝活性の大きな個体差の原因はこれまで不明であったため、申請者はニコチンの代謝経路を明らかにし、その代謝に及ぼす肝疾患と遺伝的要因の影響について検討した。

肝疾患モデルラットを作成して *in vitro* ニコチン代謝を測定し、急性肝炎では対照群と差が認められないが、肝硬変では CYP および FMO 蛋白質の発現量の低下によりコチニンとニコチン *N'*-oxide 生成が有意に減少することを明らかにした。ニコチン代謝に及ぼす影響は肝疾患の種類によって異なることを示した。

ヒトにおけるニコチンからのコチニン生成およびコチニンからの 3'-水酸化コチニン生成を触媒する酵素を同定し、両反応はいずれも CYP の 1 分子種である CYP2A6 によって触媒されることを明らかにした。CYP2A6 には遺伝的多型が存在するため、喫煙によるニコチンの体内動態と CYP2A6 遺伝子の多型解析を行った。その結果、ニコチン代謝能の著しく低い被験者が CYP2A6 遺伝子を欠損していることを明らかにした。

本研究はヒトにおけるニコチン代謝の個体差と CYP2A6 の遺伝的多型を関連づけた最初の研究であり、CYP2A6 遺伝的多型の臨床的意義に関する有用な知見を与えている。よって、博士(薬学)論文に値すると認める。