

氏 名 (本籍) 並 木 雅 幸

学 位 の 種 類 薬 学 博 士

学 位 記 番 号 薬 博 第 196 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 3 年 3 月 28 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 專 門 課 程 東 北 大 学 大 学 院 薬 学 研 究 科  
(博士課程) 薬学専攻

学 位 論 文 題 目 発 癌 性 物 質 の 活 性 化 代 謝 に 関 わ る 肝 チ ト ク ロ ー ム  
P-450アイソザイムの組織および細胞レベルにお  
ける解析

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 橋 本 嘉 幸 教 授 鈴 木 康 男

教 授 大 内 和 雄

## 論 文 内 容 要 旨

発癌性物質の活性化および解毒代謝に関わるチトクローム P-450 (以下 P-450 と略す) には、種々のアイソザイムの存在が知られ、種々動物あるいは臓器におけるこれらアイソザイムの発現パターンや誘導パターンには違いがあることが知られている。これらの知見は、癌原性化合物に対する各動物、臓器の発癌感受性を予知する上で、癌原性化合物の代謝に関わる P-450 アイソザイムの解析が極めて重要であることを示唆している。これまで、このような発癌性物質の代謝研究は、精製した P-450 アイソザイムを用いた再構成系により行われてきた。しかしながら、再構成系で得られる各酵素活性は、その構成成分の違いにより著しく異なることが知られ、これらの結果から生体における各酵素活性を把握することは難しい。それゆえ、生体により近い実験系の開発が望まれる。その目的には、特定の P-450 アイソザイムを選択的に誘導もしくは消失 (抑制) する化合物の創製や発見が必要であると考えられる。精製した P-450 アイソザイムを用いた解析より、多環式芳香族炭化水素や芳香族アミンの代謝活性化に関わるラット肝 P-450 アイソザイムとして 3-メチルコラントレン (MC) 投与により誘導される P450 I A1 および P450 I A2 が重要である事が示された。またこれらアイソザイムのうち P450 I A2 は 4-アミノアゾベンゼン (AAB) 誘導体を投与することにより、肝ミクロソーム中に選択的に誘導することが可能であることが報告されている。一方、P450 I A1 の選択的誘導剤は発見されていないが、MC を前投与したラットに四塩化炭素 ( $\text{CCl}_4$ ) をさらに処理すると芳香族炭化水素の芳香環水酸化酵素 (AHH) 活性のみを選択的に有するミクロソームが得られることが報告され、本法により P450 I A1 に富んだミクロソームの調製が可能であることが示唆された。しかしながら、このように、調製されたミクロソーム中の P-450 アイソザイムの解析は充分に行われていなかった。そこでまず、MC と  $\text{CCl}_4$  を組合せ投与した場合の肝ミクロソーム中の P-450 アイソザイムの変動を酵素学および免疫化学的手法を用いて解析し、本法により P450 I A1 に富んだミクロソームが調製できることを確認した。そこで次に、この様に調製したミクロソームを酵素源とし、種々発癌性物質の活性化代謝の検索を行い、再構成系における報告結果との異同について考察した。

また、投与された発癌性化合物が標的臓器 (細胞) に到達後、各細胞の P-450 アイソザイムがどのように変動するかを適格に把握するためには、初代培養細胞を用いるのが最も適当であると推察される。そこでまず、ラット初代培養肝細胞での種々 P-450 アイソザイムの安定性について検討を行った。一方、現在まで生体肝細胞のように P450 I A2 や P450 II B1 あるいは P450 II B2 を誘導する性質を保持した培養肝細胞株の樹立はなされていない。そこでこれら P-450 アイソザイムを発現するラット肝細胞株の樹立を試み、P450 I A2 および P450 II B1 を発現する細胞株の作成に成功した。

### (1) 発癌性化合物の変異原活性化に関わる P-450アイソザイムの簡易検索法

MC と CCl<sub>4</sub> を組合わせ投与して得られた肝ミクロソーム中の P-450アイソザイムの変動を解析し、次の結果を得た。

①MCを前投与したラットに CCl<sub>4</sub> をさらに処理すると、肝ミクロソーム中の P-450含量はMC 単独投与群と比較して約60%に減少し、MC で誘導される P-450アイソザイムが分解されることが示唆された。

②MCで誘導される P-450アイソザイムに対し、基質特性を異にすることが知られている Trp P-2 (P450 I A1, P450 I A2により活性化される) および Glu P-1 (P450 I A2により活性化され、P450 I A1ではあまり活性化されない) を基質として突然変異原性試験を行なったところ、MC+CCl<sub>4</sub> の組合わせ投与により、肝ミクロソーム中の Glu P-1の代謝活性化能 (P-450単位当たりの活性) は顕著に低下したが (MC 単独投与群の約10%), Trp P-2に対する代謝活性化能はほとんど変動しなかった。

③抗ラット P-450モノクローナル抗体を用いた Protein A-ELISA および Western blotting による免疫化学的な解析により、MC 投与により誘導される P-450アイソザイムのうち、P450 I A2 対応成分は CCl<sub>4</sub> 投与により、急速に分解されること、また P450 I A1は、CCl<sub>4</sub> 投与後も比較的安定に残存することが明かとなった。

以上の酵素学的、免疫化学的な解析により、MCを前投与したラットに CCl<sub>4</sub> を追加投与することにより、MCで誘導される P-450アイソザイムのうち、特に P450 I A2の分解が顕著に起こり、P450 I A1を選択的に保持したミクロソームが調製できることが明かになった。

そこで次に、MC と CCl<sub>4</sub> の組み合わせ投与 (MC+CCl<sub>4</sub>) により調製したミクロソームおよびその他 P-450アイソザイムを含むミクロソームを酵素源として、種々の発癌性物質の活性化代謝について検索を行ない、以下の結果を得た。尚、用いた発癌性物質は9種の芳香族アミン (Trp P-1, Trp P-2, Glu P-1, Glu P-2, A αC, MeA αC, IQ, M MeIQ および3-MeO-AAB) およびベンゾ(a)ピレン (B(a)P) である。

①検索に用いた9種の芳香族アミン系発癌剤のうち、3-MeO-AABを除いた8種の化合物は P450 I A2を含んだミクロソーム (MC 単独投与群) により高率に代謝活性化された。

②Trp P-2, A αC および MeA αC は P450 I A1のみを含んだミクロソーム (MC+CCl<sub>4</sub> 投与群) によっても高率に代謝活性化された。

③B(a)P は P450 I A1を含んだミクロソーム (MC 単独あるいは MC+CCl<sub>4</sub> 投与群) により活性化され、3-MeO-AAB は P450 II B1/II B2を含んだミクロソーム (PB 投与群) により活性化された。

これらの結果は既に報告されている再構成系での解析結果と良く一致した。故に、ラット

P450 I A1による発癌剤の代謝研究に MC+CCl<sub>4</sub> を組合わせ投与して得たマイクロソームを用いる当方法は再構成系に比較して非常に簡便であり、有用であると思われる。

## (2) 初代培養肝細胞における P-450アイソザイムの動態

種々のP-450誘導剤 (MC, PBあるいは3-MeO-AAB) で処理したラットから得た肝細胞を *in vitro* で培養し、初代培養肝細胞中の各 P-450アイソザイムの安定性について解析し、次の結果を得た。

①種々のP-450アイソザイムを *in vivo* で誘導した肝細胞を *in vitro* 培養すると、その細胞内の P-450含量の低下が見られた。

②免疫化学的な解析 (Protein A-ELISA, Western blot) により、認識されるマイクロソーム中の P450 I A2や P450 II B1および P450 II B2に対応する成分は P450 I A1に対応する成分に比較して早期に分解消失することが明らかとなった。

③突然変異原性試験による酵素活性およびその基質特異性の検索からも P450 I A1は P450 I A2や P450 II B1および P450 II B2に比較してより安定に培養肝細胞中に残存することが明らかとなった。

## (3) 種々のP-450アイソザイムを発現するラット肝細胞株の樹立

初代培養肝細胞に種々の発肝癌性物質 (Trp P-1, Trp P-2, AAFおよび3-MeO-AAB) を処理し、P-450アイソザイムを発現する株化細胞の樹立を試みた。得られた結果を次に示した。

①初代培養肝細胞を3-MeO-AABで処理した場合にのみ、継代培養可能な株化細胞が得られた。

②得られた株化細胞を限界希釈法によりクローン化を行い、8種のクローン (30-1から30-8) 細胞を得た。

③得られたクローンのうち、最も増殖性の高い30-3細胞の P-450アイソザイムの発現について免疫化学的な解析を行なったところ、P-450誘導剤の処理、無処理によらず、P450 I A2および P450 II B1/II B2に対応する成分の発現が細胞密度の高い部位にのみ起こった。また、P450 I A1 対応成分は検出されなかった。

④種々のP-450アイソザイムの cDNA をプローブとして、30-3細胞における P-450アイソザイムの mRNA の発現を検索した。30-3細胞は P450 I A1, I A2, II B1の mRNA を発現していた。P450 I A1, I A2はベンズアントラセン (BA) を処理することにより、初期 (BA 処理15-30分後) に mRNA の増加が認められたが、その後 mRNA の発現は徐々に減少した。また、P450 II B1の mRNA 発現は細胞が confluent になった3日後から認められ、PB 処理によりさらにその発現量は増加した。

本研究により、P450 I A1およびP450 I A2が関わる発癌剤の代謝研究にはMC単独投与およびMC+CCl<sub>4</sub>の組合わせ投与により得られるミクロソームが酵素源として有用であり、これらミクロソームを用いることにより、再構成系での実験に比較し、より簡便に、しかも生体条件に近い状態での各酵素活性を測定することが可能となった。またP-450アイソザイムを発現する培養肝細胞株の樹立に成功した。今後、本細胞株はP450 I A2やP450 II B1/II B2の遺伝子レベルにおける発現制御機構の解析のための有用な材料になると期待される。

## 審査結果の要旨

これまで、発癌性物質の代謝とチトクローム P-450 との関係についての研究には精製した P-450 アイソザイムを用いた再構成系が用いられた。しかしながら、再構成系で得られる各酵素活性は、その構成成分の違いにより著しく異なることが知られ、これらの結果から生体における各酵素活性を把握することは困難であり、生体により近い実験系の開発が望まれていた。

著者はまず、メチルコラントレンと四塩化炭素を投与した場合の肝ミクロソーム中の P-450 アイソザイムの変動を酵素学および免疫化学的手法を用いて解析し、本法により P450 I A1 に富んだミクロソームが調製できることを確認し（第2章）、またこの方法が化学物質の癌原性スクリーニングとして活用できることを証明した（第3章）。

投与された発癌性化合物が標的臓器（細胞）に到達後、各細胞の P-450 アイソザイムがどのように変動するかを適格に把握するためには、初代培養細胞を用いるのが最も適当であると考えられる。そこでまず、ラット初代培養肝細胞での P-450 アイソザイムの安定性について検討が行われ、種々の P-450 アイソザイムを誘導した肝細胞を培養すると、その細胞内の P450 含量の低下が見られ、ミクロソーム中の P-450 I A2 や P450 II B1 および P-450 II B2 は P450 I A1 に比較して早期に分解消失することが明らかにされた。また、突然変異原性試験による酵素活性およびその基質特異性の検索からも P450 I A1 は P450 I A2、P450 II B1 および P450 II B2 に比較してより安定に培養肝細胞中に残存することが示された（第4章）。

現在までに P-450 I A2 や P450 II B1 あるいは P-450 II B2 を誘導する性質を保持した培養肝細胞株は樹立されていない。そこで初代培養肝細胞を種々の発肝癌性物質で処理し、P-450 アイソザイムを発現する株化細胞の樹立を試行した結果、初代培養肝細胞を 3-メトキシ-4-アミノアゾベンゼンで処理することにより継代培養可能な株化細胞を得、この株化細胞から 8 種のクローン細胞を樹立することに成功した。

最も増殖性の高いクローン細胞について解析したところ、P-450 誘導剤の処理、無処理によらず、P-450 I A2 および P450 II B1/II B2 の発現が細胞密度の高い部位にみられた。さらに種々の P-450 アイソザイムの cDNA をプローブとして、P-450 アイソザイムの mRNA の発現について検索した結果、P450 I A1、I A2、II B1 の mRNA の発現が確認され、また細胞をベンズアントラセンで処理することにより、P450 I A1 と I A2 の mRNA の増加が、また、フェノバルビタール処理により P450 II B1 の mRNA 発現量の増加が認められた（第5章）。

以上の研究は簡便な化学物質の癌原性検索法の開発並びに特定の P-450 アイソザイムを発現している肝臓細胞クローンの樹立など極めて有用な知見を提供するものであり、博士論文として評価できる。