

氏 名 (国籍) ノラチャティティヤポット Wachiraporn
Noracharttiyapot Wachiraporn

学位の種類 博 士 (薬 学)

学位記番号 薬 博 第 373 号

学位授与年月日 平成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科、専攻 東北大学大学院薬学研究科
(博士課程) 医療薬科学専攻

学位論文題目

Development of a gene-reporter assay system for evaluation of
CYP3A4 inducibility of chemical
(CYP3A4 誘導評価のための遺伝子レポーターアッセイシステム
の開発)

論文審査委員 (主 査) 教 授 山 添 康
教 授 中 畑 則 道
助教授 眞 野 成 康

論文內容要旨

CYP3A4 is a major form of drug-metabolizing enzyme in human liver and intestine, and may mediate the oxidative metabolism of more than 60% of therapeutic drugs. A number of structurally unrelated compounds are associated with the induction. Thus, assessment to verify whether drugs induce CYP3A4 is necessary prior in their clinical application.

In the present study, cell lines, which stably express a reporter protein through the CYP3A4 gene transcriptional activation, have been developed for the use of prediction of the CYP3A4 induction. DNA tandemly ligated with CYP3A4 promoter-enhancer-luciferase was stably intergated into HepG2 cells together with neomycin-resistant plasmid at a ratio of 5:1. Twelve clones showing distinct profiles on chemical-induced responses were isolated. Among them, two clones, clone 3-1-10 and 3-1-20 were further evaluated their sensitivities, reproducibilities and applicabilities to predict CYP3A4 induction in human. Optimal plating densities and highly reproducible response were observed at the range of 1.65×10^4 - 0.5×10^5 per cm^2 . Although the cell density affected the levels of the activity, clear induction responses of more than ten chemicals were observed in both cell lines with nifedipine, omeprazole and troglitazone. The induction responses were maintained for more than 6 months, due to the stable introduction of CYP3A4 reporter plasmid DNA into cell chromosome. Surprisingly, the overexpression of hPXR did not clearly enhance the reporter activity in our systems.

To assess the practical applicability, more than 20 pesticides were tested on their CYP3A4 gene activation. Pesticides were classified into three groups from their induction responses. Higher responses of reporter activity to pesticides were observed in clone 3-1-10 than in clone 3-1-20; dithiopyr, dymron, flutamil, isofenfos and pyributacarb (24.5-, 16.8-, 18.4-, 21.8- and 17-fold increases) at 10 μM pesticides for 2 days-exposure. In contrast, higher response was observed in clone 3-1-20 with isoxathion (11.9-fold increase). To further investigate the pesticide-mediated activation of hPXR, an in vivo system have been established by use of the adenovirus. Co-infection of Ad hPXR and Ad CYP3A4-362-7.7k to mice, result in the more than 30-fold enhancement of the luciferase activity with permethrin, whereas no clear activation was observed with the pesticide on the control mice.

Collectively, our established gene reporter assay systems will offer advantages for chemical screening of human CYP3A4 inducibility at the early stage of the drug development.

審査結果の要旨

薬物で治療している患者の治療効果や副作用の発現に個人間で大きな違いが見られる。薬物によって、これらの差異が無視できることもあるが、継続使用を不可能にし、市場からの回収に至ることもある。これらの問題には薬物の使用方法、併用薬物そして薬物応答や代謝能力についての患者側の要因が関わっている。薬物は、薬効を期待して使用されるが、この目的以外に患者の肝や小腸における薬物を代謝する能力に影響することがある。このような影響の1つが酵素誘導と呼ばれ、薬物代謝酵素の含量増加によって薬物動態が変化する。酵素誘導は薬物代謝酵素に限局されないが、チトクロム P450 に代表される薬物代謝酵素は、顕著な誘導応答を示す酵素として知られている。臨床において薬効の相乗効果を期待して、日常的に複数の薬物が同時に使用されている。この結果使用している或る薬物がチトクロム P450 を誘導し、その結果併用薬物の動態に影響して治療効果の変動や有害事象の出現を招くことがある。創薬技術の進歩によって高い標的選択性を示す薬物が開発されるようになった。この選択性は、一般に基本クラス構造に立体環境を付加する官能基を導入して得られている。このような薬物は、従来の同効薬物に比べて、大きな分子サイズを持ち、しかも脂溶性が高いことを特徴とする。脂溶性薬物はチトクロム P450 による酸化によって、水溶性の代謝物へ変換されることが体外への除去に必須で、大きな分子サイズを持つ薬物は CYP3A4 によって代謝されることが多い CYP3A4 はヒトの肝と小腸の主要 P450 分子種で、酵素誘導を受ける代表的分子種でもある。従って開発中の候補薬物が、酵素誘導に、ことに CYP3A4 誘導への関わりを早期に知ることが必要となっている。既に知られているようにヒトと実験動物の CYP3A 酵素誘導には、種差があり、実験動物での結果をヒトに適用できない。近年、ヒト初代培養肝細胞が試験系として利用されてきたが、供給とコストの両面から開発早期への適用に難があった。そこで現在、培養細胞系の利用と試験系の開発が世界的に進められている。本研究では、まずヒトゲノム DNA から CYP3A4 遺伝子を単離し、その発現調節関与部位とルシフェラーゼの融合遺伝子を作成して、ヒト肝由来の HepG2 細胞に導入した。さらに導入細胞から恒常的に目的遺伝子を発現する安定発現株を選抜し、次いで応答性比較によって高感度試験に適用可能な2株を得た。両株は多くの CYP3A4 誘導性を示す薬物に応答し、高い検出能を示した。この過程で、原因は明確でないが、両株は互い異なる応答性を持つことが明らかとなった。これら両株を併用することで、広い検出スペクトルを持つ系の開発に成功した。この試験系の有用性を知るため、研究の進んでいない農薬の酵素誘導能試験としての可能性を検討し、従来は実験動物系の結果に留まっていた農薬のヒトへの影響を知る優れた系であることを示した。予試験ではあるがヒト CYP3A4 遺伝子のマウス個体への導入によって種差を明確に知る系の開発にも成功している。これらの成果は、基礎研究に留まらず、薬物の安全性評価に寄与することが期待される。

よって、博士（薬学）の学位論文として合格と認める。