

氏 名	高 橋 浩 子
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 7 0 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 2 0 年 3 月 2 5 日
学 位 論 文 題 目	Effect of D256N and Y483D on propofol glucuronidation by human UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A9)  (UDP-グルクロン酸転移酵素 UGT1A9 の D256N、Y483D 変異がプロポフォ ール代謝に及ぼす影響)
審 査 委 員	主 査 教 授 山 路 昭 副 査 教 授 大 久 保 岩 男 副 査 教 授 岡 村 富 夫

## 論文内容要旨

※整理番号	575	(ふりがな) 氏	たかはし ひろこ 高橋 浩子
学位論文題目	Effect of D256N and Y483D on propofol glucuronidation by human UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A9) (UDP-グルクロン酸転移酵素 UGT1A9 の D256N、Y483D 変異がプロポフォール代謝に及ぼす影響)		
【研究の目的】	<p>UDP-グルクロン酸転移酵素 (以下 UGT)は肝臓での薬物代謝の第 2 相を担う酵素であり、内在性物質や薬物の代謝、解毒に重要な役割を果たす。UGT は UGT1 と UGT2 の 2 つのサブファミリーに分類される。そのうち UGT1 は 13 の可変エクソン 1 と共通エクソン 2-5 を持ち、エクソン 1 を mRNA レベルでスプライシングにより切り替えることで一つの遺伝子から、様々な基質に対応する 8 種の酵素をコードしている(UGT1A1-UGT1A10)。UGT1A9 は UGT1 に属し主にはフェノール類を代謝する酵素である。静脈麻酔薬である propofol は UGT1A9 のみによって代謝される薬剤である。他に mycophenol acid、1-naphthol、naringenin なども主に UGT1A9 が解毒代謝を行っている。UGT1A9 の変異および遺伝子多型は、主に UGT1A9 が代謝解毒する薬剤の薬物動態および副作用の発現に大きな影響を及ぼすと考えた。そこで (1) 日本人の UGT1A9 の遺伝子多型解析を行った。(2) (1) で得られた多型 (変異) と UGT1 の共通エクソンの変異で過去に他の分子種 (UGT1A1, UGT1A6) で酵素活性に大きな影響を与えることの判明している Y486D 変異 (UGT1A9 では Y483D) について、propofol、mycophenol acid、1-naphthol、naringenin の解毒代謝に及ぼす影響を検討した。</p>		
【方法】	<p>(1) 健康ボランティア 100 人の末梢血から DNA を抽出し、UGT1A9 に特異的なプライマーを設計して PCR 法によりエクソン 1 の部位とイントロン 1 の一部を増幅した後、ダイレクトシーケンスを行って塩基配列を確認した。</p> <p>(2) 培養細胞による発現実験系を用いた UGT1A9 の活性の測定</p> <p>① 発現ベクターの作成および発現実験：肝臓 cDNA ライブラリーより PCR 法で UGT1A9 の cDNA を増幅し pCR3.1 ベクターに組み込んで発現ベクターを作成した。変異は site directed mutagenesis 法により導入した。COS7 細胞にリポフェクション法を用いて野生型と変異 (D256N, Y486D) をもつ UGT1A9 を発現させた。</p> <p>② 酵素活性の測定：150 μg の細胞破碎溶液に 50mM-Tris-HCl buffer (pH7.5)、10mM MgCl<sub>2</sub>、8.5mM サッカロラクトン、UDP-グルクロン酸、基質、[<sup>14</sup>C] UDP-グルクロン酸を、37°C で 25 分反応させた後、100%エタノールで反応を止め、濃縮したものを薄層クロマトグラフィーで展開し、Instant Imager (Packard) で活性を測定した。</p>		

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

(続 紙)

③ ウエスタンブロッティング：細胞破碎溶液を電気泳動後、PVDF membrane (BIO-RAD) に転写した。ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences) を用いて UGT1A 抗体を反応させ、発現酵素量を定量した。

④ データ解析：実験で得られた各酵素の  $K_m$ 、 $V_{max}$ 、efficiency ( $V_{max}/K_m$ ) について分散分析を行った。

#### 【結果】

(1) 100 検体中 1 検体に D256N (ヘテロ接合体) を認めた。遺伝子頻度は 0.005 であった。

(2) D256N、Y483D 変異をもつ UGT1A9 の propofol 代謝活性 (efficiency) はそれぞれ野生型の 19.1%、57.1% に低下していた。Mycophenol acid、1-naphthol、naringenin に対する D256N の  $V_{max}$  は野生型に対しそれぞれ 9.5%、66.2%、23.6% に低下しており、Y483D は 33.6%、126.2%、77.8% であった。D256N の代謝活性は著明に低下していたのに対し、Y483D は基質によっては代謝活性を増加するものもあった。

#### 【考察】

(1) 日本人 100 人の解析では 1 人に D256N を認めた。遺伝子頻度は 0.005 であり、多型ではなく変異であった。癌患者を対象とした解析で遺伝子頻度が 0.0082-0.0092 であったという報告があったが、健康日本人の解析は今回が初めてである。

(2) 変異を持つ UGT1A9 の propofol に対する活性は、野生型に比べ D256N は 19.1%、Y483D は 57.1% と低下がみられた。D256N は野生型のみならず Y483D に比べても有意に UGT1A9 の活性を下げる事が判明した。他の基質 (mycophenol acid、1-naphthol、naringenin) においても D256N による酵素活性の低下は著しく、薬剤代謝および副作用の発現にかかわっている可能性が示唆された。D256N は日本人と Asian-American にのみ報告されており、アジアにおいては薬剤代謝にかかわる重要な変異である。Y483D は共通エクソン上の変異であり、これまでの我々の検討では、UGT1A1 においてはビリルビンの代謝を 10% 以下に、UGT1A6 では flutamide に対する活性が失われることが明らかになっている。しかし UGT1A9 においては propofol に対する  $V_{max}$  と efficiency が各々 28.8% と 57.1% までしか低下しておらず、同じ UGT1 でも isoform により Y483D の及ぼす影響が異なることが明らかになった。

#### 【結論】

1. 健康な日本人における D256N の遺伝子頻度を明らかにした。
2. Propofol、mycophenol acid、1-naphthol、naringenin において、D256N は Y483D よりも著しく UGT1A9 の解毒活性を低下させることを明らかにした。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	575	氏名	高橋 浩子
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>UDP グルクロン酸転移酵素 (UGT) は肝臓での薬物代謝の第二相を担う酵素であり、内在性物質や薬物の代謝、解毒に重要な役割を果たす。本研究は、その isoform の一つである UGT 1A9 に着目し、日本人での遺伝子多型解析を行い、認められた D256N 変異と他の分子種で判明している Y483D 変異について、propofol 等の解毒代謝に及ぼす影響を発現実験系で検討したものである。</p> <p>その結果、1) 日本人健康ボランティア 100 人中 1 検体に D256N 変異 (ヘテロ接合体) を認めた。2) UGT 1A9・D256N は propofol の代謝活性を野生型に比べて有意に低下させた。Y483D は低下させるものの有意差はなかった。また D256N は mycophenolic acid, 1-naphthol, naringenin に対しても代謝活性を低下させた。</p> <p>本研究では、健康な日本人で初めて UGT 1A9 の D256N 変異を明らかにし、その変異が propofol の解毒活性を低下させることを認め、それら薬剤の臨床での副作用発現との関連性を示唆するものである。よって、博士 (医学) の学位を授与するに値すると認められた。</p>			
(平成 20 年 1 月 31 日)			