

たばこ煙中のがん原物質代謝と代謝酵素の発現調節

根本 信雄*

はじめに

たばこ煙中にはがんを誘発する化合物が多数検出されている。それらが体内に摂取されると、酵素の働きで代謝変換され、大部分は解毒化されて体外に排泄されてしまうが、一部は活性化されて遺伝子傷害を誘発する。遺伝子に傷害を受けた細胞はアポトーシス死するか、遺伝子の突然変異による細胞のがん化を招く（図-1）。代謝過程で中心的役割を果たしているのがシトクロム P450 で、がん原物質の種類に応じて複数の P450 分子種の関与が確認されている。研究対象としている P450 分子種は限られたものであるが、たばことの関わりから多数の P450 分子種の研究が進められている。しかし、長年広い分野から検討されてきたにもかかわらず、未だ解明されていない事項や、新たな問題点も出てきている。本トピックスでは、そうした中で特にがん原性芳香族炭化水素活性化との関わりが強い、

CYP1 ファミリー酵素による、活性化の機構やこれら酵素の発現調節機構について、周辺情報を含めてまとめた。

芳香族炭化水素の活性化経路

たばこ煙中の芳香族炭化水素 polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) は P450 によってエポキシドが形成され、引き続きエポキシド加水酵素 epoxide hydrase (EH) による加水分解で、PAH-diols が生成される。PAH-diols はさらに P450 によって DNA に傷害を与える活性化型代謝物の PAH diol-epoxides、または aldo-keto reductase (AKR) によって反応性に富む PAH o-quinones に変換される。PAH の代表例としてベンツピレン (BP) の場合は、図-2 に示すような活性化体生成経路が提唱されている¹⁾。BP が P450 によって (+)- または (-)-BP-7,8-oxide へ、ついで EH による加水分解で (-)- または (+)-BP-7,8-diol となる。さらに P450 による酸化反応で、湾領域 7,8-diol-9,10-oxide の異性体が 4 種類生成され、中では (+)-BP-7,8-diol-9,10-oxide-2 がもっとも活性に富む。また BP-7,8-diol は、AKR (DT-diaphorase とも呼ばれている) によってキノン体 (BP-7,8-dione) に変換されると、DNA と安定な付加体を形成するが、脱プリン塩基反応を招来する。別の経路として、BP は peroxidase の一電子酸化機構によりカチオンラジカルを形成し、DNA と反応すると、脱プリン塩基反応を招来する。さらにエポキシド由来のフェノールから酵素の介在なしに生成するキノンに対して、NAD(P)H キノン酸化還元酵素 1 が働くと、ヒドロキノン類が生成し、DNA と反応する。このように様々な

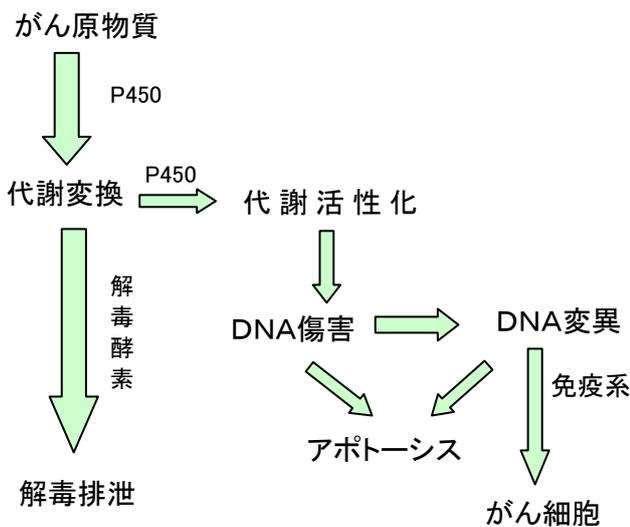
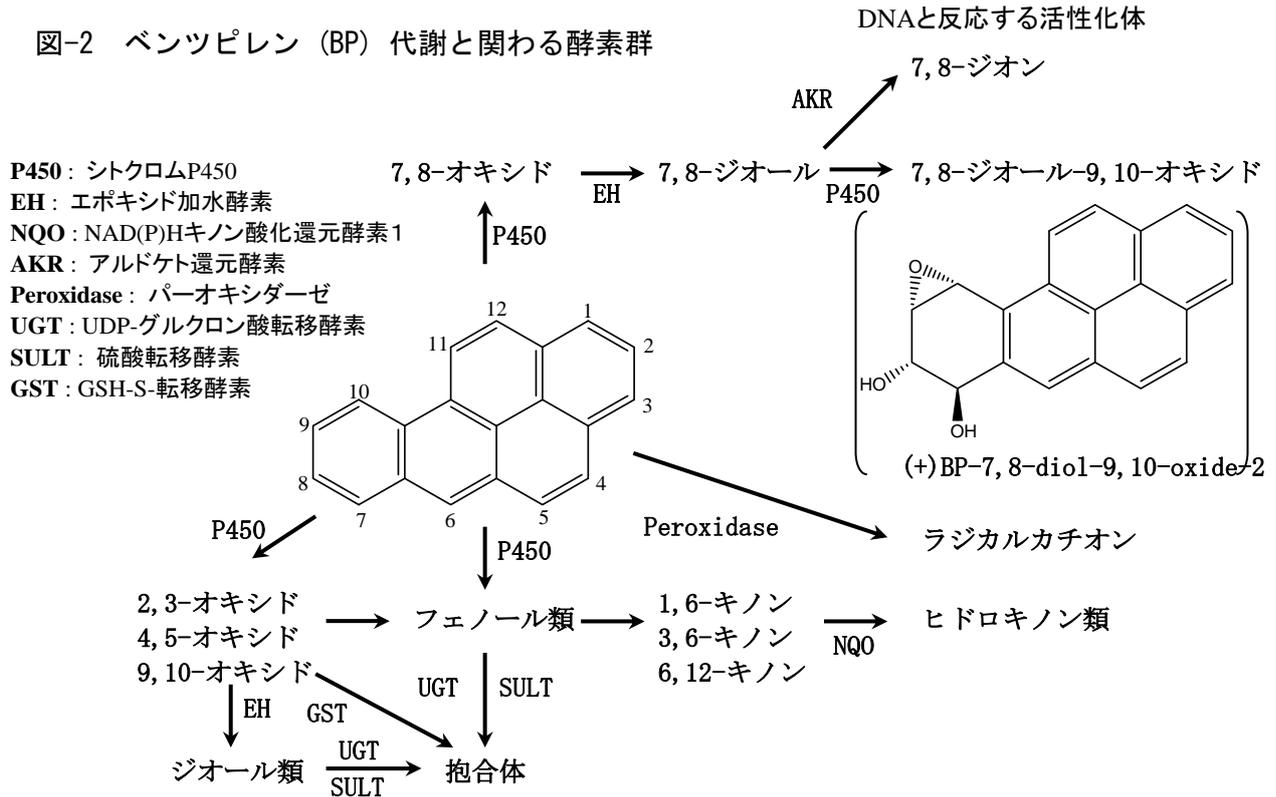


図-1 がん細胞発生過程での代謝酵素の役割

* 富山大学大学院医学薬学研究部

図-2 ベンツピレン (BP) 代謝と関わる酵素群



経路から DNA 傷害を誘起する活性化体が生成される。BP の腫瘍誘発組織におけるこれら酵素の発現状態は一様ではないので、組織によって関わる活性化経路は異なることが予想される。BP による皮膚がん形成は *CYP1A1* 遺伝子欠損マウスで低減する²⁾ことから、この P450 が代謝活性化に関与していることは確かであるが、NAD(P)Hキノン酸化還元酵素 1 遺伝子欠損マウスでもがん形成率は減少した³⁾ので、実際にはそれぞれの酵素がどの程度寄与するのであるかは不明である。従って複数の代謝活性化経路が関わる場合に、特定の活性化系のみを抑えることでがん発生率を下げることは難しい。

さらに、がん原物質の代謝は BP の例を見ても分かるように、活性化系と解毒化系とが複雑に絡み合っている。動物実験ではヒトが曝露するがん原物質の量を遙かに超えて実験を行うために、低濃度に曝露している状態と代謝が異なることが予想される。こうした方向から、関わる酵素の役割を解析するための適切なアプローチ方法の開発が必要である。次章以下では、*CYP1*

遺伝子の発現調節機構及び遺伝子型とがん化との関連について記述する。

代謝活性化に関わる酵素

CYP1 ファミリーに属する 3 種類の P450 は、いずれも動物種を越えてアミノ酸配列相性は高く、それぞれの種で、CYP1A1、CYP1A2、そして CYP1B1 と呼ばれている。その中で CYP1A2 は肝臓で常在的に発現し、その発現量はヒトにおいては CYP3A、CYP2C に次ぐものであり、総 P450 量の約 10% にあたる。また肝臓以外の組織での発現はほとんど認められない。それに対し、CYP1A1 と CYP1B1 の常在的な発現は肝臓ではほとんど認められず、それ以外の組織で高い。CYP1A1 の発現は、脳、脳下垂体、胸腺、肺臓、心臓、腎臓、副腎、脾臓、膵臓、小腸、大腸、末梢リンパ球、乳腺、子宮、卵巣、胎盤、精巣、前立腺に認められ、CYP1B1 は膵臓以外のこれらの組織に認められ、発現量も消化管を除いて CYP1A1 よりも多い。また胎児期やいくつかのがん組織でも発現している。さらに、いずれの分子種も、環境汚染物質と

して代表的なダイオキシンやたばこ煙に含まれる BP などの芳香族炭化水素によって発現誘導を受ける。CYP1A2 の誘導発現は肝臓に限定されるが、CYP1A1 と CYP1B1 の誘導発現は肝臓を含めてどの組織でも起こり、CYP1A1 と CYP1B1 とを比較すると、発現量の比はほとんどの組織で常在的な発現と逆転している。

CYP1A1 遺伝子を欠損させたマウスにおける実験では、経口投与した BP の毒性が現れるため、CYP1A1 の役割として、解毒に関わることが示唆されている⁴⁾。また *CYP1B1* 欠損マウスにおける実験結果から、この P450 が BP の活性化に主として関わり、脾臓や骨髄での毒性発現から免疫不全現象を引き起こすことを観察した⁴⁾。ヒト CYP1B1 と CYP1A1 とを比較した実験では、BP を BP-diol に変換する活性は、CYP1B1 の方が 10 倍高いことが分かった。

誘導発現機構は、3 種の CYP1 ファミリーともに、ダイオキシンや芳香族炭化水素の受容体のアрил炭化水素受容体 (AhR) を介する経路が主たるものであることは分かっていたので、CYP1A1 をモデルにして詳細な解析が進められてきた。ところが、CYP1A2 と CYP1B1 の AhR 以降のシグナル伝達経路は CYP1A1 とは同じではないことが明らかとなった。すなわち、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1 のいずれも誘導には、誘導剤による AhR の活性化が必要であるが、CYP1A1 誘導発現のように、アрил炭化水素核移送体 AhR nuclear translocator (Arnt) とのヘテロ二重体の形成後に調節領域の一つ異物応答領域 xenobiotic responsive element (XRE) へ結合し、転写活性化する機構があてはまることはまだ証明されていない。また CYP1A2 については、誘導発現はもとより常在的な発現についても、まだ転写に関わる因子は解明されていない。CYP1B1 についても AhR を介する経路は未解明であるが、エストロゲンによる活性化系の存在も提唱されている。

マウスには CYP1A1 が誘導される系統とされない系統とが存在し、その違いは AhR の構造に由来し、誘導されない系統では誘導剤への親和

性が低いためであることが分かった。ヒト AhR の構造は、マウスの誘導されない系統の AhR に近いことから、ヒトでこれらの P450 は誘導されにくいのではないかと考えられている。

最近 AhR の役割として、ダイオキシンなどの異物応答性遺伝子のメディエーター以外に *AhR* 遺伝子欠損マウスでみられる様々な現象から、臓器形成、免疫不全、骨粗鬆症などにも関わっていることが分かってきた。例えば、*AhR* 遺伝子欠損マウスを長期間飼育すると、脱肛がしばしば観察され、大腸がんも高頻度に発生する⁵⁾ことが明らかとなってきた。また進化的に計算すると *AhR* 遺伝子は約 4 億 5 千万年前に地球上に出現したと考えられている。その時代にリガンドであるダイオキシンは当然存在しない。こうしたことから AhR は誕生前の器官形成期以外に、成熟してからも体内環境を整えるために機能していることが想像されるので、内在性物質がリガンドとして考えられ、いくつかの候補物質が提唱されている。その他にも、AhR とエストロゲン受容体 (ER) との相互作用の確認から、ダイオキシンや芳香族炭化水素類の内分泌かく乱作用の発現メカニズムも分かってきた。遺伝子レベルの実験では、活性化された AhR は ER の分解を促進するためにエストロゲン依存性遺伝子の発現を抑制することが示唆されている⁶⁾。従って、たばこ煙含有物質による AhR の活性化によって、今まで想定もされていなかった経路に喫煙が影響する可能性が出てきた。

遺伝的多型

CYP1 ファミリーの遺伝子多型とがんとの感受性についての報告は多いが、以下のように関係するとするものとしないとするものがある。がんの発生には様々な因子が絡み合っていることを考えると、代謝酵素遺伝子型からだけで説明することは出来ないかもしれない。詳細については別稿を参照にされたい。

CYP1A1 多型には少なくとも 11 種類ある。日本人の制限酵素 MspI 多型 (CYP1A1*2A) 及びヘム結合領域の Ile-Val 多型 (CYP1A1*2B) と喫

煙と関連するといわれる扁平上皮がん発生、またアフリカ系米国人の CYP1A1*3 と肺腺がん発生との関連などが報告されているが、全ての人種に共通する多型は見つかっていない。

CYP1A2 多型には少なくとも 24 種類ある。日本人喫煙者の CYP1A2*1C 多型はカフェイン代謝能力が劣ることが報告されている。その他にも代謝能力が劣る多型があるが、がんとの関係はみられていない。

CYP1B1 多型には少なくとも 23 種類ある。完全欠損者と緑内障発生の遺伝との相関性が報告されている。CYP1B1*2 多型は、肺の扁平上皮がんと乳がん感受性との相関がみられている。乳がんでは、中国人の CYP1B1 多型 (Val432Leu) との関連もあった。スウェーデンやオランダでは CYP1B1 多型と肺がんとの相関は認められなかった。

CYP1A2 の発現調節機構

CYP1A2 はカフェインなどのぜんそく薬の代謝に関わるのみならず、がん原物質が遺伝子傷害を誘発する代謝的活性化体への変換も行う極めて重要な酵素である。一方、CYP1A1 と CYP1B1 の基質はほとんどががん原物質である。CYP1A2 が肝臓では 3 番目に多く発現しているにもかかわらず、遺伝子レベルの発現調節機構の研究が進まなかった理由は、研究の場として必要な細胞培養に適切な系が無かったためである。これは肝臓で常在的に発現している他の P450 分子種にも当てはまるのではあるが、肝臓の実質細胞を初代培養系にすることで発現が急減する。一方、肝臓以外の継代培養細胞では CYP1A2 をはじめとする、医薬品代謝で中心的役割を果たしている肝臓常在性の P450 を発現させることは困難であるが、CYP1A1 の誘導発現に関しては多くの培養細胞系で可能であるので、この P450 の調節機構の研究は非常に進んでいる。

研究目的に合致した培養細胞系を得ることが必要であることから、我々はマウス肝細胞を一般的な単層培養ではなくスフェロイド培養することで、常在的及び誘導的な発現状態が改善さ

れたので、この培養系を用いて CYP1A2 遺伝子の発現調節機構の研究を開始した。

マウス CYP1A2 遺伝子の 5' 上流域の常在的発現調節に関わる領域は、約 4.3 kb 上流に存在する発がんプロモーター 12-O-tetra-decanoylphorbol-13-acetate (TPA) 応答配列内の領域 (E1 と命名) に絞られ、この領域を欠損させると、転写活性は完全に消失した。この E1 をプローブとしてゲルシフトアッセイを行うと、細胞核のタンパクの中に特異的に結合するものが認められた。現在結合したタンパクの同定を行っている⁷⁾。

マウス CYP1A2 遺伝子と CYP1A1 遺伝子とは同じ第 9 染色体上に位置していることは以前から分かっていたが、マウス遺伝子の全塩基配列が明らかとされたので、両者の位置関係を調べたところ、意外なことが分かった。図-3 に示すように両者は近接しており、転写は互いに反対方向に起こり、両者の第一エクソン間の距離は 4272 塩基であることが分かった。従って、我々が報告した CYP1A2 遺伝子の常在的な発現に係わる、エンハンサー領域 E1 が CYP1A1 遺伝子の第一エクソン内にあることが分かった。

マウスと同じく、ラットとヒトでも CYP1A2 遺伝子と CYP1A1 遺伝子は隣接し、互いに逆方向に転写される。図-3 に示すように両遺伝子の第一エクソンの間は、ラットでは 19.3 kb、ヒトでは 23.8 kb の距離がある。最近ヒト遺伝子のこの領域に存在する 10 個以上の XRE を検討したところ、CYP1A1 遺伝子の転写開始部位に近接する数個の XRE 配列が、CYP1A2 遺伝子と CYP1A1 遺伝子両方の誘導に必要であることが明らかとなった⁸⁾。しかし、AhR リガンドによる転写活性化が両方向に働くならば何故 CYP1A1 遺伝子の誘導が様々な組織で認められるのに対し、CYP1A2 遺伝子の誘導発現は、肝臓でのみ観察される理由を解明しなければならない。マウス CYP1A2 遺伝子と CYP1A1 遺伝子の間には XRE を 3 個含むが、現在のところ誘導に機能している確証は得られていない。

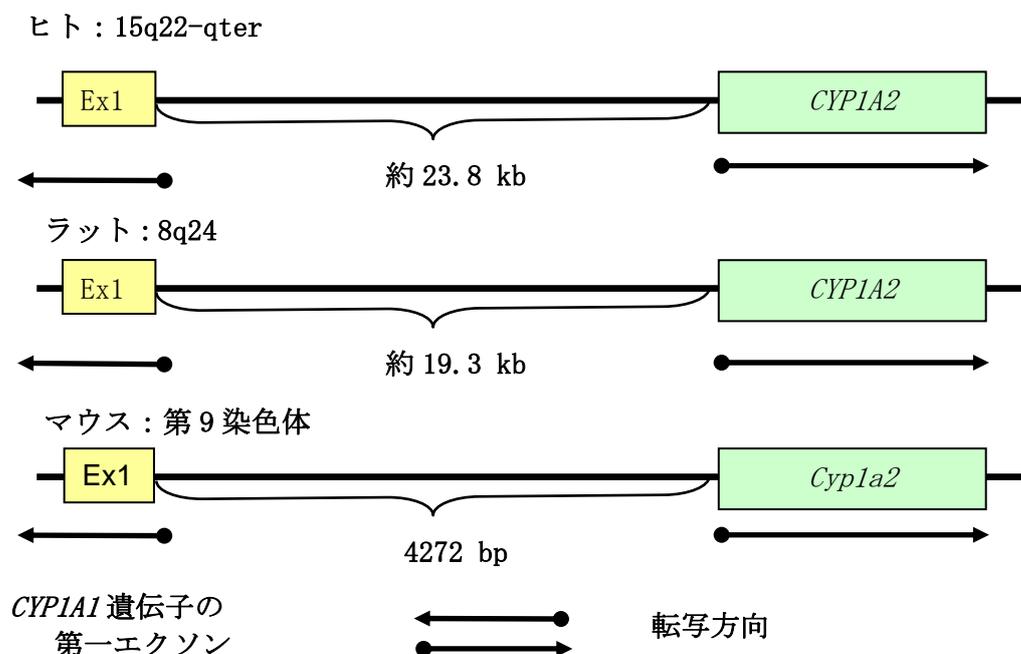


図-3 CYP1A1 遺伝子と CYP1A2 遺伝子の染色体マップ

今後の方向性

がん原性芳香族炭化水素の代謝と関わる代謝酵素の研究分野の成果の一部について概観したが、「喫煙とがん」の観点から今後検討すべき問題点をあげたい。

1) 新しく見つかったアリル炭化水素受容体の機能の解明と喫煙の影響

AhR 遺伝子欠損動物の実験から、形態形成、免疫不全、骨粗鬆症、さらに大腸がん発生などに AhR が何らかの役割を果たしていることが示唆されている。この AhR のリガンドとなる物質が多数たばこ煙中に存在するので、喫煙との相関性の検討が必要である。

2) たばこ煙中に発見されたがん原物質の代謝酵素の発現メカニズム

代謝酵素の発現調節機構の解明は、酵素活性に個体差がある要因を明らかに出来、がん発症の予防やテーラーメイド医療の一助となる。

CYP1A2 遺伝子と CYP1A1 遺伝子との染色体上の位置関係が明らかとなったので、前者の肝臓特異的な発現メカニズムの解明が必要である。

たばこ煙中のがん原物質の代謝活性化には、他の P450 分子種も関わっている。それらの発現調節機構は必ずしも解明されていない。特に常在性に発現している P450 分子種の中で医薬品代謝に一番関わっている CYP3A4 は、4-(N-nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) の代謝を行うので、発現調節機構の解析が必要である。

3) 今後発見が予想される転写因子の役割解明

現在未解明の遺伝子調節機構の解析が進み、調節因子が明らかとなると、それへの喫煙の影響を調べなければならない。

文献

- 1) Shimada T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. Drug Metab Pharmacokinet 2006; 21: 257-76.
- 2) Gonzalez FJ, Kimura S. Study of P450 function using gene knockout and transgenic mice. Arch Biochem Biophys 2003; 409: 153-8.
- 3) Long DJ 2nd, Waikel RL, Wang XJ, Roop DR, Jaiswal AK. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 deficiency and increased susceptibility to 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced carcinogenesis in mouse skin. J Natl Cancer

Inst 2001; 93: 1166-70.

- 4) Uno S et al. Oral benzo[a]pyrene in *Cyp1* knockout mouse lines: CYP1A1 important in detoxication, CYP1B1 metabolism required for immune damage independent of total-body burden and clearance rate. *Mol Pharmacol* 2006; 69: 1103-14.
- 5) 川尻 要. Aryl hydrocarbon receptor の大腸がん抑制機能. シンポジウム『内・外環境と生物応答』 2006; 7月、福岡.
- 6) Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriyama Y, Kato S. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 2003; 423: 487-8.
- 7) Uchida Y, Yano A, Kumakura S, Sakuma T, Nemoto N. Enhancer elements in the mouse *CYP1A2* gene for constitutive expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 1297.
- 8) Ueda R, Iketaki H, Nagata K, Kimura S, Gonzalez FJ, Kusano K, Yoshimura T, Yamazoe Y. A common regulatory region functions bidirectionally in transcriptional activation of the human *CYP1A1* and *CYP1A2* genes. *Mol Pharmacol* 2006; 69: 1924-30.