

## ニコチン代謝の個人差に影響をおよぼす遺伝子多型

中島 美紀\*、横井 毅\*

### はじめに

臨床で使用されている薬の 90% 以上はシトクロム cytochrome P450 (CYP) で代謝される。CYP を始めとするほとんど全ての薬物代謝酵素には遺伝子多型が存在し、薬物代謝能の個人差の原因となっている。代謝能の個人差は、薬効および副作用発症の個人差にも関連するため、個別化医療いわゆるオーダーメイド医療の実現をめざして研究がなされている。CYP は薬物の代謝を触媒するだけでなく、食餌や嗜好品として摂取される生体外異物の解毒代謝も担う。ニコチンはたばこの主成分であり、喫煙者はニコチンの体内の濃度を一定に保とうとして喫煙する。喫煙によるニコチンの吸収は非常に速く、静脈内投与に匹敵するほどといわれる。ニコチンの腎排泄は 2-15% 程度であり、体内からの消失は肝代謝に依存する。多くの種類の代謝物が認められているが、主要な代謝反応はコチニンへの酸化であり、CYP の分子種である CYP2A6 によって触媒されることを我々は最初に報告した<sup>1)</sup>。代謝物にはニコチンに認められる薬理作用はほとんどないため、ニコチンの代謝はニコチンの薬理作用の持続あるいは消失におけるキーファクターとなる。喫煙は肺がんだけでなく、さまざまな循環器疾患と関連する。本稿ではニコチン代謝の個人差とその原因となる CYP の遺伝子多型に関する著者らの研究成果を中心に述べる。

### ニコチンの代謝

吸収されたニコチンの 80-90% はコチニンへ

と代謝され、さらにトランス 3'-水酸化コチニンへと代謝される (図-1)。ニコチンからのコチニンへの代謝反応は殆どが CYP2A6 によって触媒されることを我々は 1996 年に報告した<sup>1)</sup>。一方、コチニンからのトランス 3'-水酸化コチニン生成活性は CYP2A6 によって特異的に触媒されることも同年に報告した<sup>2)</sup>。ニコチンとコチニンはグルクロン酸抱合反応を受けて、*N*-グルクロン酸抱合体、トランス 3'-水酸化コチニンは *O*-グルクロン酸抱合体へと代謝される。ニコチンとコチニンの *N*-グルクロン酸抱合活性は UDP-グルクロン酸転移酵素である UGT1A4 によって主に触媒され、一部 UGT1A9 によっても代謝されることを報告した<sup>3)</sup>。一方、トランス 3'-水酸化コチニンの *O*-グルクロン酸抱合反応は主に UGT2B7 によって、一部 UGT1A9 によって触媒されることを見出した<sup>4)</sup>。ニコチンとコチニンはそれぞれ *N*-酸化反応を受けてニコチン 1'-*N*-オキシドおよびコチニン 1'-*N*-オキシドへと代謝される。ニコチン 1'-*N*-オキシドへの代謝はフラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO3) によって触媒される。また、ニコチンとコチニンはそれぞれ脱メチル化されてノルニコチンとノルコチニンへと代謝されるが、ノルコチニン生成もまた CYP2A6 によって触媒される。

### CYP2A6 の遺伝子多型

ヒトの CYP2A サブファミリーには CYP2A6、CYP2A7、CYP2A13 がある。これらの遺伝子は 350 kbp のクラスターを形成して第 19 染色体上に存在しており、遺伝子配列の相同性が極めて高い。肝臓において CYP2A7 mRNA は CYP2A6 mRNA と同等あるいはそれ以上の発現量を示すにも関わら

\*金沢大学大学院医学系研究科薬物代謝化学

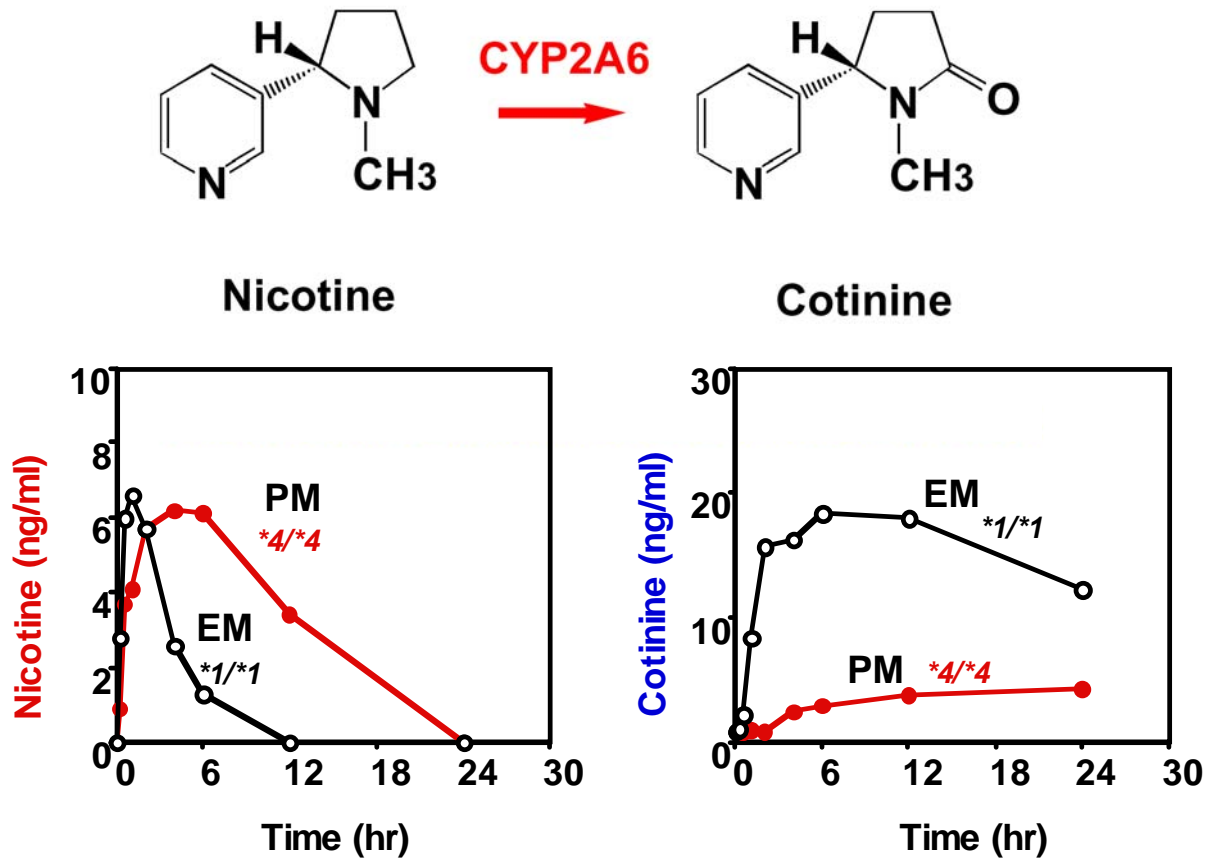


図-1 ニコチン代謝多型とヒト CYP2A6 の包括的研究

ず、翻訳された蛋白はヘムを取り込むことができず酵素活性を示さない。CYP2A13 は鼻粘膜や肺での発現量は高いものの肝における発現は低く、CYP2A6 の特異的酵素活性であるクマリン7-水酸化反応に対して CYP2A6 の 10 分の 1 程度の比活性しか示さない。

CYP2A6 には遺伝子多型が存在し (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2a6.htm>)、多くの変異型が報告されている。CYP2A6\*4 は遺伝子全欠損型であり、ホモで有する場合、酵素活性は全く認められない。CYP2A6\*2、CYP2A6\*5、CYP2A6\*6、CYP2A6\*7、CYP2A6\*10、CYP2A6\*11、CYP2A6\*17 は SNP により酵素活性が欠損あるいは低下する。CYP2A6\*9、CYP2A6\*1D、CYP2A6\*1H に認められる 5'-上流領域の SNP は転写活性を低下させることがルシフェラーゼアッセイによって示されている。CYP2A6\*1B は 3'-非翻訳領域の一部が CYP2A7 の配列と遺伝子置換したもの

で、酵素活性への影響はほとんどないと考えられている。CYP2A6\*1X2 は遺伝子重複型であり、重複によって生じた遺伝子のエクソン 9 以降は CYP2A7 の配列となっている。CYP2A6\*12 はエクソン 2 までが CYP2A7 の配列を有する。CYP2A6 は CYP2A7 との塩基配列の相同性が高いために、このような CYP2A7 との遺伝子置換型の変異型が多いようである。

#### ニコチン代謝の個人差と CYP2A6 の遺伝子多型の関係

ニコチンの消失半減期は約 2 時間であるのに対し、コチニンの消失半減期は約 20 時間と 10 倍ほど長い。たばこを 1 本喫煙した後の最高血中濃度 (C<sub>max</sub>) は約 10 ng/ml であり、繰り返し喫煙した後では数 10 ng/ml に達することもある。一方、コチニンの血中濃度はニコチンよりも著しく高く、数 10~数 100 ng/ml と

なる。代謝能の個人差を評価するために、プローブ薬を投与した後の親化合物と代謝物の血中濃度や尿中排泄量を測定し、その比を算出することが一般に用いられる。通常の喫煙状態における血中コチニン濃度は、喫煙量を反映した濃度でほぼ定常状態にあると考えられるが、ニコチンの消失半減期は短いため、最終喫煙後の採血のタイミングによって、コチニン/ニコチン濃度変動することは容易に予測できる。従って、喫煙者におけるニコチン代謝能を通常の喫煙条件下で分析することは困難であり、2週間以上の禁煙が必要とされる。そこで著者らは非喫煙者を対象とし、ニコチンガムを利用したニコチン代謝のフェノタイピング法を確立した<sup>5)6)</sup>。ニコチンガムを1個30分間咀嚼した2時間後の血中ニコチンおよびコチニン濃度を測定し、コチニン/ニコチン濃度比を算出する、という簡便で非侵襲的な方法である。

日本人92名を対象としてフェノタイピングを行ったところ、3名の被験者では全くコチニンが検出されず、その他89名のコチニン/ニコチン濃度比は0.1から14.7と、100倍以上もの大きな個人差が認められた<sup>7)</sup>。コチニン/ニコチン濃度比のプロビットプロット解析を行い、横軸に血中濃度比を、縦軸には percent area under the normal probability curve ( $i \times 100 / (n + 1)$ )、 $i$ は血中濃度比が低い順番に被験者を並び変えた時の順位、 $n$ は被験者数をプロットする。集団が正規分布に従う時、プロットは直線性を示すが、正規分布に従わない時はプロットは変曲点を有し、その変曲点をもとに、代謝能の低いヒト poor metabolizer (PM) か代謝能の正常なヒト extensive metabolizer (EM) が判断できる。この解析により、コチニン/ニコチン濃度比が0.6付近に明らかに変曲点が認められ、PMが存在することが示された<sup>6)</sup>。

多くの *CYP2A6* 遺伝子変異型の中で、日本人には *CYP2A6\*1B*、*CYP2A6\*4*、*CYP2A6\*7*、*CYP2A6\*8*、*CYP2A6\*9*、*CYP2A6\*10*、*CYP2A6\*11* が認められており、詳しくは我々の総説を参照願いたい<sup>8)</sup>。特に *CYP2A6\*4* と *CYP2A6\*9* の遺伝子頻度は約

20% と高い。*CYP2A6\*4*、*CYP2A6\*7*、*CYP2A6\*9* または *CYP2A6\*10* の変異型をホモで有する被験者、あるいは、いずれかを組み合わせでヘテロで有する被験者は代謝能の低い PM となることが示された<sup>7)9)10)</sup>。特に *CYP2A6\*4* をホモで有する被験者では2時間後ではコチニンが全く検出されず、コチニン/ニコチン血中濃度比はゼロであった<sup>11)</sup>。

日本人では認められず白人に存在する遺伝子変異型については、*CYP2A6\*2* を有する喫煙者では血中コチニン濃度が野性型の喫煙者に比べて低い傾向を示し、遺伝子重複型である *CYP2A6\*1X2* を有する喫煙者は血中のコチニン濃度が高いことが報告されている。しかし、喫煙の指標となる一酸化炭素レベルも同様にそれぞれ低値および高値を示しているため、喫煙者におけるニコチン代謝能を評価する場合には、喫煙量または喫煙の深度が影響している可能性を考慮する必要が示唆される。以上のように、ニコチンの代謝能には個人差があり、*CYP2A6* の遺伝子多型との関連を明白にした。

### CYP2A6 欠損者におけるニコチンの体内動態と代謝

*CYP2A6\*4* をホモで有する全欠損者におけるニコチン摂取後のニコチンとコチニンの血中濃度推移について検討した。*CYP2A6* 遺伝子が正常(野性型)の被験者では  $C_{max}$  が4-6時間でコチニンが検出され、ニコチンの消失半減期が約2時間であるのに対し、*CYP2A6* 遺伝子全欠損者ではコチニンの AUC は正常人の約 1/15 程度であり、ニコチンの消失半減期も約11時間と顕著に延長していることが認められている<sup>5)</sup>。*CYP2A6* を欠損しているにも関わらずコチニンが若干であるが生成しているのは、上述のようにコチニン生成活性は *CYP2A6* 以外の CYP 分子種にも認められているため、それらの酵素がコチニン生成を代償的に触媒している可能性が考えられる。

我々はニコチンがコチニンへ代謝されない *CYP2A6* 欠損者におけるニコチンの代謝プロフ

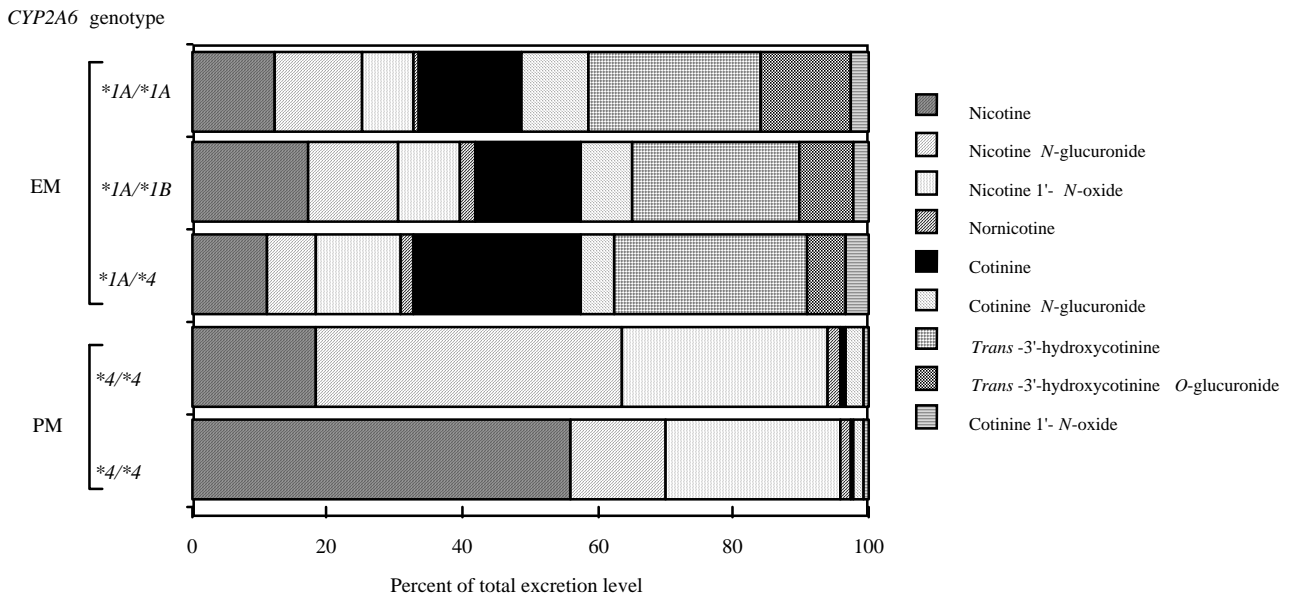


図-2 Excretion levels of nicotine and its metabolites in 24-hr accumulated urine samples. *CYP2A6* genotypes in 5 subjects were determined. Norcotinine was not detected in any subjects.

ファイルを明らかにした<sup>12)</sup>。ニコチンガム 1 個咀嚼後、24 時間の蓄尿中におけるニコチンと代謝物の排泄量を定量したところ、*CYP2A6* 遺伝子が正常な EM の 3 名において、吸収されたニコチンは主にトランス 3'-水酸化コチニンとして排泄されていた (24.9-28.6%) (図-2)。その他、コチニン (15.0-24.5%)、コチニン *N*-グルクロン酸抱合体 (5.1-10.2%)、トランス 3'-水酸化コチニン *O*-グルクロン酸抱合体 (5.3-12.9%) として主に排泄されていた。一方、*CYP2A6* 遺伝子全欠損者ではコチニン (0.3-1.0%) とコチニン *N*-グルクロン酸抱合体 (1.5-2.4%) として排泄されている量は顕著に低く、トランス 3'-水酸化コチニンとその *O*-グルクロン酸抱合体は検出されなかった。その代替排泄物質として、ニコチン (18.0-56.1%)、ニコチン *N*-グルクロン酸抱合体 (14.2-45.6%) またはニコチン 1'-*N*-オキシド (25.8-30.6%) として排泄される量が増大していることが示された (図-2)。以上のように、*CYP2A6* を欠損することによって、ニコチン代謝のプロファイルが影響を受けていることが明らかになった<sup>12)</sup>。

#### ニコチン代謝の人種差と新たな変異型の発見

ヒトにおけるニコチン代謝の個体差とニコチンの代謝酵素である *CYP2A6* の遺伝的多型の人種差を明らかにする研究として、日本人と韓国人について検討した。健常日本人 92 名と健常韓国人 209 名を対象とし上記のニコチン代謝試験および末梢血より調製したゲノム DNA を用いて *CYP2A6* の遺伝子型を判定した (図-3)<sup>13)</sup>。

その結果、血中ニコチン濃度は日本人では 1.27-16.24 ng/ml、韓国人では 0.25-11.80 ng/ml であった。また、コチニンは日本人 3 名および韓国人 4 名において検出されず、日本人で 0-41.39 ng/ml、韓国人で 0-143.93 ng/ml であった。ニコチン代謝能の指標であるコチニン/ニコチン血中濃度比は日本人では 0-14.71、韓国人では 0-143.93 と大きな個体差が認められた。韓国人におけるプロビットプロットは日本人におけるものよりも高い血中濃度比側にシフトしており、また、ホモ *CYP2A6\*4* と判定された日本人 3 名と韓国人 4 名はいずれもコチニンが検出されず、PM と考えられた。日本人における *CYP2A6\*1A*、*CYP2A6\*1B*、*CYP2A6\*4* の遺伝子頻度はそれぞれ 42.4%、37.5% および 20.1% であり、韓国人では 45.7%、42.8% および 11.0% であった。*CYP2A6\*2* と *CYP2A6\*3* はいずれの人種

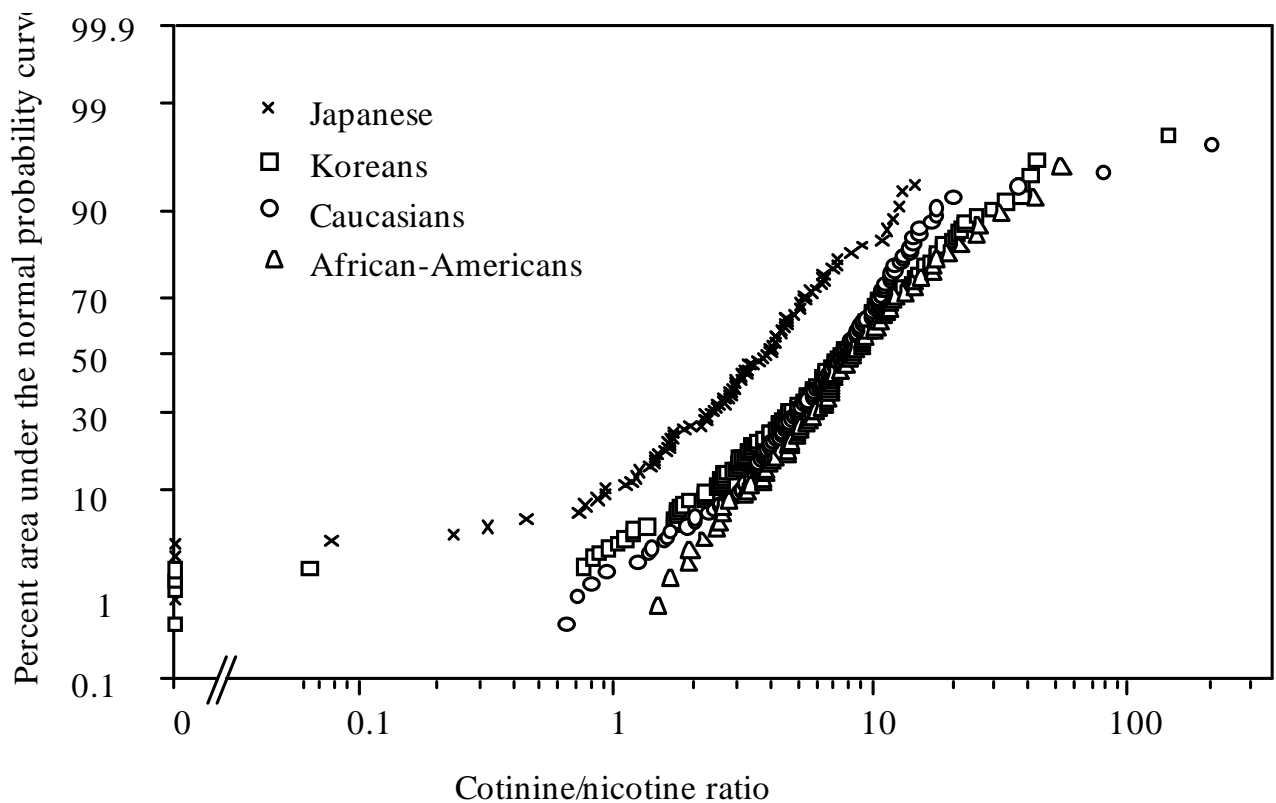


図-3 Probit analysis for cotinine/nicotine ratio of the plasma concentration in 155 Caucasians, 84 African-Americans, 209 Koreans, and 92 Japanese.

においても認められず、*CYP2A6\*5* は日本人では存在しなかったが、韓国人では 0.5% であった。このように *CYP2A6* の遺伝子頻度には人種差が認められた。ホモ *CYP2A6\*4* と判定された日本人 3 名と韓国人 4 名ではコチニンが検出されず、ヘテロ *CYP2A6\*4* では低いニコチン代謝能を、*CYP2A6\*1B* は *CYP2A6\*1A* に比べて高い代謝能を示す傾向が認められた (図-3)。日本人に比べて韓国人の方がニコチン代謝能が高く、人種差が存在することが示された<sup>13)</sup>。

さらに、白人 155 名と黒人 84 名についても同様に検討した (図-3)<sup>14)</sup>。その結果、血中ニコチン濃度は白人で 0.1-8.4 ng/ml、黒人で 0.2-4.5 ng/ml であった。コチニンは白人で 1.1-36.7 ng/ml、黒人で 3.8-37.0 ng/ml であった。ニコチン代謝能の指標であるコチニン/ニコチン血中濃度比は白人で 0.6-208.2、黒人で 1.4-51.7 と大きな個体差が認められた。白人および黒人におけるコチニン/ニコチン血中濃度比のプロビットプロットをこれまでに得られている日本人と韓国人と比較した。その結果、

日本人と韓国人におけるプロットは血中濃度比が 0.6 付近でカーブしたが、白人と黒人では明白な変曲点が認められなかった。白人 ( $8.7 \pm 17.5$ )、黒人 ( $8.8 \pm 8.0$ ) および韓国人 ( $8.7 \pm 11.9$ ) に比べて日本人 ( $3.8 \pm 3.1$ ) が有意に ( $p < 0.0001$ ) ニコチン代謝能が低いことが明らかになった (図-3)<sup>14)</sup>。

この研究の過程において、これまでに報告のない新たな遺伝子多型を多く見出し、それらの変異がニコチン代謝活性に及ぼす影響について詳細に検討し国際命名委員会から公表された (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2a6.htm>)。

これまでに我々は、新たに *CYP2A6\*1F*、*CYP2A6\*1G*、*CYP2A6\*9A*、*CYP2A6\*10*、*CYP2A6\*17*、*CYP2A6\*18A*、*CYP2A6\*18B*、*CYP2A6\*19* と *CYP2A6\*20* の 9 種類について報告してきた<sup>15)-18)</sup>。

本研究ではこれまで確立してきたニコチンガムを用いた *in vivo* ニコチン代謝試験を白人および黒人に適用し、同じ試験法で 4 人種における *CYP2A6* 酵素活性の人種差を検討することが可能となった。その結果、白人に比べて黒人の

方がプロビットプロットが右側にシフトしていたことより、若干代謝能が高い傾向が認められたが、有意差は認められなかった。従って、これまで喫煙によるニコチン摂取でコチニン濃度が黒人で高いと報告されていたのは、CYP2A6の代謝能が高いためではないことが明らかになった。また、日本人だけが他の3人種と比べて有意にコチニン生成能が低い人種であることが明らかになった。以上のように、人種差を検討するには同じフェノタイプング法で評価することが重要であることが示された。

### CYP2A6 遺伝子多型と喫煙および 肺がん感受性との関係

喫煙者はニコチンの血中濃度を維持しようとして喫煙すると考えられている。CYP2A6 酵素の機能が低下していると、ニコチンが体内に長く貯留するため、喫煙量が少なくなることが考えられる。喫煙量が CYP2A6 の遺伝子多型と関連するという報告がある一方で関連がないという報告もある。また CYP2A6 はたばこに含まれるニトロソアミン類を代謝的に活性化するため、CYP2A6 の酵素活性が低下していれば、がんになりやすいと予想される。日本人においては、CYP2A6\*4 を有すると肺がんリスクが低いことが報告されている。しかしながら、フランス人においては CYP2A6 の遺伝子変異と肺がん感受性には関連がないことが報告されている。CYP2A6\*4 の遺伝子頻度が白人に比べて日本人で高いことが、両研究結果の違いの一つの原因とも考えられる。

### おわりに

ニコチンはニコチンガムまたはニコチンパッチなどの製剤で禁煙補助剤として投与される場合がある。CYP2A6 を欠損した人ではニコチンの体内動態が大きく影響を受けていること、日本人では特に欠損した人の割合が高い<sup>8)</sup>ことから、こうした製剤の使用にも注意を払う必要があるかもしれない。一般に、薬物代謝酵素の遺伝子多型は、薬効または副作用の個人差と関連する

ことから注目され、臨床における薬物治療においても考慮されつつある。CYP2A6 はニコチン以外にも、抗がん薬テガフルやファドロゾール、麻酔薬ハロタン、抗てんかん薬バルプロ酸などの代謝も触媒するが、これらの代謝は CYP2A6 に特異的ではないものが多く、CYP2A6 の遺伝子多型が薬物治療において影響を及ぼした例はこれまでのところほとんどない。しかし、CYP2A6 が特異的に代謝を触媒する薬物の場合は、CYP2A6 の遺伝子変異によって副作用を誘発する可能性が十分に考えられる。この可能性は、医薬品の開発から臨床における薬物治療の場においても念頭に置く必要がある。

### 文 献

- 1) Nakajima M, Yamamoto T, Nunoya K, Yokoi T, Nagashima K, Inoue K, Funae Y, Shimada N, Kamataki T, Kuroiwa Y. Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug Metab Dispos* 1996; 24: 1212-7.
- 2) Nakajima M, Yokoi T, Nunoya K, Nagashima K, Inoue K, Funae Y, Shimada N, Kamataki T, Yamamoto T, Kuroiwa Y. Characterization of CYP2A6 involved in 3'-hydroxylation of cotinine in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277: 1010-5.
- 3) Nakajima M, Sakata N, Ohashi N, Kume T, Yokoi T. Characterization of nicotine and cotinine N-glucuronidation in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2002; 30: 1484-90.
- 4) Yamanaka H, Nakajima M, Katoh M, Kanoh A, Tamura O, Ishibashi H, Yokoi T. *Trans*-3'-hydroxycotinine O- and N-glucuronidations in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 23-30.
- 5) Nakajima M, Yamagishi S, Yamamoto H, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Yokoi T. Deficient cotinine formation from nicotine is ascribed to the whole deletion of the CYP2A6 gene in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 67: 57-69.
- 6) Nakajima M, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Yokoi T. Improved high-sensitive method for determination of nicotine and cotinine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr* 2000; 742: 211-5.
- 7) Nakajima M, Kwon J, Zenta T, Tanaka N, Yamamoto Y, Yamamoto H, Yamazaki H, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Yokoi T. Relationship between inter-individual differences in nicotine metabolism and CYP2A6 genetic polymorphism in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 72-8.

- 8) Nakajima M, Kuroiwa Y, Yokoi T. Inter-individual differences in nicotine metabolism and genetic polymorphisms of human CYP2A6. *Drug Metab Rev* 2002; 34: 865-77.
- 9) Yoshida R, Nakajima M, Watanabe Y, Kwon J, Yokoi T. Genetic polymorphisms in human *CYP2A6* gene causing impaired nicotine metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 2002; 54: 511-7.
- 10) Yoshida R, Nakajima M, Nishimura K, Tokudome S, Kwon J-T, Yokoi T. Effects of polymorphism in promoter region of human *CYP2A6* gene (*CYP2A6\*9*) on expression level of mRNA and enzymatic activity *in vivo* and *in vitro*. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 74: 69-76.
- 11) Nakajima M, Yoshida R, Fukami T, McLeod HL, Yokoi T. Novel human CYP2A6 alleles confound gene deletion analysis. *FEBS Lett* 2004; 569: 75-81.
- 12) Yamanaka H, Nakajima M, Nishimura K, Yoshida R, Fukami T, Katoh M, Yokoi T. Metabolic profile of nicotine in subjects whose *CYP2A6* gene is deleted. *Eur J Pharm Sci* 2004; 22: 419-25.
- 13) Kwon J, Nakajima M, Chai S, Yom Y, Kim HK, Yamamoto Y, Yamazaki H, Sohn DR, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Yokoi T. Nicotine metabolism and CYP2A6 allele frequencies in Koreans. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 317-23.
- 14) Nakajima M, Fukami T, Yamanaka H, Higashi E, Sakai H, Yoshida R, Kwon JT, McLeod HL, Yokoi T. Comprehensive evaluation of variability in nicotine metabolism and CYP2A6 polymorphic alleles in four ethnic populations. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80: 282-97.
- 15) Fukami T, Nakajima M, Higashi E, Yamanaka H, McLeod HL, Yokoi T. A novel CYP2A6\*20 allele found in African-American population produces a truncated protein lacking enzymatic activity. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 801-8.
- 16) Fukami T, Nakajima M, Higashi E, Yamanaka H, Sakai H, McLeod HL, Yokoi T. Characterization of novel CYP2A6 polymorphic alleles (CYP2A6\*18 and CYP2A6\*19) that affect enzymatic activity. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 1202-10.
- 17) Fukami T, Nakajima M, Yoshida R, Tsuchiya Y, Fujiki Y, Katoh M, McLeod HL, Yokoi T. A novel polymorphism of human CYP2A6 gene, CYP2A6\*17, has an amino acid substitution (V365M) that reduces enzymatic activity *in vitro* and *in vivo*. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 76: 519-27.
- 18) Fukami T, Nakajima M, Sakai H, McLeod HL, Yokoi T. CYP2A7 polymorphic alleles confound the genotyping of CYP2A6\*4A allele. *Pharmacogenomics J* 2006, in press.