

内分泌かく乱物質・性ステロイド代謝に関与する遺伝子の多型と機能の解析

主任研究者 岸 玲子 北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野教授

研究協力者 佐田 文宏、戸崎 静香、貢 英彦、片倉 洋子

研究要旨

シトクロム P450 (CYP) 遺伝子スーパーファミリーは、非常に多くの薬物、発癌物質、毒素などの外因性化学物質およびステロイド、脂肪酸、プロスタグランジンなどの内因性化合物の酸化代謝を触媒する一群のヘム蛋白質をコード化している。このうち CYP1A1, 1B1, 3A4 などは、Ah 受容体などの核内受容体とともに 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) などの内分泌かく乱物質やテストステロン、エストラジオールなどの性ステロイドの代謝に関わり、グルタチオン転移酵素 (GST) など抱合反応により不活化（解毒）を担う第 2 相の酵素群と連携している。CYP3A4 はヒトの肝臓、腎臓および小腸で発現し、臨床的に、生理学的におよび中毒学的に重要な多くの化合物の代謝に関与している。テストステロンの 2 β , 6 β , 15 β の水酸化反応やエストラジオールの 16 α の水酸化反応などには、この酵素が関わっている。

本研究では、内分泌かく乱物質の生殖機能と次世代への影響、特に生殖泌尿器系・先天異常の成因を遺伝子レベルで明らかにすることを目的として、尿道下裂等の先天異常の患者と親および不育・不妊症例の遺伝子多型を検索し、機能の不明な変異に関しては、*in vitro* の発現系を用い、薬物動態の解析を行う。

CYP3A4 遺伝子の変異型アリル CYP3A4*2 (Ser222Pro) は、ニフェジピンに対して、野生型に比べると低い固有クリアランスを持つが、テストステロンの 6 β の水酸化反応に対しては、野生型と有意差は認められなかった。不育症例において、GSTM1 の完全欠損型の頻度は 63.5% と高頻度であった。

今後、尿道下裂、停留精巣など先天異常に関し、親の機能異常を伴う遺伝子型による次世代影響を、不育症に加え不妊症および子宮内膜症における症例の遺伝子型の関与を検討する予定である。

A. 研究目的

本研究では、内分泌かく乱物質の生殖機能と次世代への影響、特に生殖泌尿器系・先天異常の成因を遺伝子レベルで明らかにすることを目的

としている。内分泌かく乱化学物質の代謝に関係の深いシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ、グルタチオン転移酵素などの薬物代謝酵素、ステロイド代謝・合成酵素および Ah 受

容体、アンドロゲン受容体などの核内受容体の遺伝子多型について検討する。このような遺伝子多型による個体の感受性の検討は予防上重要である。

B. 研究方法

内分泌かく乱化学物質の代謝に関連のあると考えられている CYP1A1、1B1、3A4、GSTM1、Ah 受容体等の薬物・ステロイド代謝酵素、核内受容体の遺伝子多型の解析を行う。尿道下裂等の先天異常の患者と親および不育・不妊症例および対照群とする妊婦は出産時に採取した血液から、DNA 抽出し、PCR-RFLP 法により、遺伝子型をスクリーニングし、一部はシークエンスも行う。機能の不明な変異に関しては、*in vitro* の発現系を用い、薬物動態の解析を行う。最終年度に、これらの結果を基に、内分泌かく乱化学物質の、次世代の先天異常の神経内分泌系への影響や生殖毒性を総合的に検討する。

（倫理面への配慮）

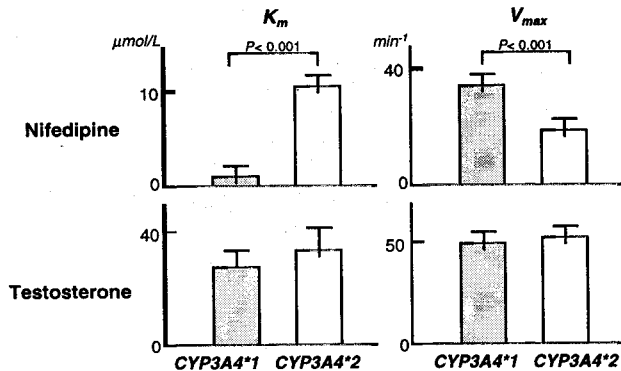
疫学調査におけるインフォームドコンセントはヘルシンキ宣言に基づき、調査研究を行った時点で最良と考えられている方法を採用している。患者または家族が研究への参加を自発的に中止しても不利益を被らないよう配慮している。対象者のプライ

バシーの保持には細心の注意を払い、対象者が研究に参加することによって不利益を被ることがないように配慮している。

C. 研究結果

テストステロンやエストラジオールの代謝に関与する CYP3A4 遺伝子のエクソン 7 にある 222 番目のセリンがプロリンに代わる変異型アリル CYP3A4*2 の機能を、バキュロウィルスを用いた cDNA 発現系を用いて明らかにした。CYP3A4*2 は、ニフェジピンに対して、野生型に比べると低い固有クリアランスを持つが、テストステロンの 6 β の水酸化反応に対しては、野生型と有意差は認められなかった。不育症例において、CYP1A1 の 3' 側の変異型アリル CYP1A1*2A (*MspI* 多型) の頻度は 31.5% (ホモ型 10.7%、ヘテロ型 41.7%) で、過去の報告にみられる健常日本人の頻度と大差はみられなかったが、GSTM1 の完全欠損型の頻度は 63.5% と高頻度であった。今後、尿道下裂、停留精巣など先天異常に関し、親の機能異常を伴う遺伝子型による次世代影響を、不育症に加え不妊症および子宮内膜症における症例の遺伝子型の関与を検討する予定である。

図 野生型 *CYP3A4*1* と変異型 *CYP3A4*2* のニフェジピンとテストステロンに対するミカエリス定数 (K_m) と最大速度 (V_{max})



D. 考察

Baranova ら (1997, 1999) は、子宮内膜症患者に GSTM1 の完全欠損型および NAT2 の代謝遅延型の頻度が高いことを示し、Fritsche ら (1998) は、*CYP1A1* 遺伝子の変異が、Dowsing ら (1999) は、アンドロゲンレセプター遺伝子の CAG 繰り返し部分の長さが、男性不妊のリスクを高めることを示している。いずれも内分泌かく乱化学物質の生殖機能への影響の可能性を指摘している。本研究では、不育症とグルタチオン転移酵素遺伝子の機能欠損型との関連など新しい知見が得られ、さらに詳細に内分泌かく乱化学物質との関連を検討することが必要と考えられた。

E. 結論

CYP3A4 遺伝子の変異型アリル

*CYP3A4*2* (Ser222Pro) は、ニフェジピンに対して、野生型に比べると低い固有クリアランスを持つが、テストステロンの 6β の水酸化反応に対しては、野生型と有意差は認められなかった。また、不育症例において、GSTM1 の完全欠損型の頻度は 63.5% と高頻度であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP, Zheng W, Raunio H, Crespi CL, and Gonzalez FJ: *CYP3A4* allelic variants with amino acid substitutions in exon 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clin Pharmacol Ther* 67: 48-56, 2000.

Saarikoski ST, Sata F, Husgafvel-Pursiainen K, Rautalahti M, Haukka J, Jarvisalo J, Impivaara O, Vainio H, and Hirvonen A: *CYP2D6* ultrarapid metabolizer genotype as a potential modifier of smoking behavior. *Pharmacogenetics* 10:5-10, 2000.

2. 学会発表

Sata F, Sapone A, Elizondo G, Raunio H and Gonzalez FJ: A *CYP3A4* polymorphism involving an amino acid substitution in exon 7. 11th International Conference on Cytochrome P450, Sendai,

August 29-September 2, 1999

G. 知的所有権の所有状況

該当なし