

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293128

研究課題名(和文) 腫瘍組織におけるオーファンP450発現の病態生理学的意義の解明と創薬への応用

研究課題名(英文) Elucidation on pathophysiological significance of orphan P450 expression in tumor tissue and its application to drug discovery research

研究代表者

前川 京子 (Maekawa, Keiko)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・室長

研究者番号：70270626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：オーファンP450に属するヒトCYP2U1、CYP4X1、CYP4Z1を対象に、酵素機能と分子構造学的特性の解明、及び腫瘍における高発現の病態生理学的意義の解明を目的とした。大腸菌発現系では、各分子種の組換え酵素を、活性型酵素として発現できず、N末端領域の改変や培養条件のさらなる検討が必要と考えられた。バキュロウイルス-カイコ発現系により発現させたCYP2U1を用いて内在性基質の網羅的探索を開始した。乳がん症例の腫瘍部に高発現していたCYP4Z1 mRNAは、腫瘍部に高レベルで存在する酸化脂肪酸分子種と有意に相関しており、腫瘍の発達及び増悪に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify 1) functional and structural characteristics of orphan P450s, CYP2U1, CYP4X1, and CYP4Z1, and 2) their pathophysiological roles in tumor tissues. In *E. coli* expression systems, recombinant orphan P450 enzymes were present as P420 apoenzymes not as P450 holoenzymes, and further examination is necessary to find out optimal N-terminal modifications and expression conditions. We started to explore endogenous substrates of CYP2U1 expressed by baculovirus-silkworm expression systems. Highly expressed CYP4Z1 mRNA in breast cancer tissues were significantly correlated with several oxidative fatty acid levels, suggesting important roles of CYP4Z1 on tumor growth and progression.

研究分野：ファーマコメタボロミクス

キーワード：酸化還元酵素 癌 生理活性

## 1. 研究開始当初の背景

チトクローム P450 (P450) は、その活性中心にヘムを含有するモノオキシゲナーゼであり、ステロール、脂肪酸、ビタミン等の内因性物質、及び化学物質、薬剤等の外因性物質の代謝に重要な役割を果たしている。ヒトにおいて、57種のP450が存在することが知られているが、そのうち約25%はオーファンP450と呼ばれる生理学的機能及び内因性基質が不明なP450である (Guengerich FP, Cheng Q, Pharmacol Rev 63:684-699, 2011.)。オーファンP450のうち、CYP2U1、CYP4X1、CYP4Z1は、大腸がん、乳がん、卵巣がん等の腫瘍組織に高く発現することが知られており、近年、欧米人においてCYP4X1及びCYP4Z1の発現レベルが、各種がんの悪性度や予後と相関することが報告された (Downie D et al, Clin Cancer Res 11:7369-75, 2005., Murray GI et al, Histopathology 57:202-211, 2010.)。しかしながら、人種差 (遺伝子多型等) を考慮し、日本人におけるこれらの分子種の発現と各種がんの臨床病理学的情報との関連は明らかにされていない。これらの分子種は、内因性の生理活性物質の活性化または不活性化を介して腫瘍の発達及び増悪に関与することが示唆されているが、腫瘍組織における真の内因性基質は依然不明である。従って、真の内因性基質及びその代謝物が腫瘍の増殖やシグナル伝達に与える影響は未解明であり、診断・治療標的としての重要性は確立されていない。

P450の機能の多様性は、基質結合部位の立体構造の多様性と密接に関連している。これまでにヒトの主要な薬物代謝酵素であるCYP3A4やCYP2C9、及びステロイドホルモンの合成に関与するCYP19等のX線構造解析が報告され、基質または阻害剤と各P450の結合様式が同定されている (Dong D et al, Pharmacol Rev 44:192-208, 2012.)。得られる知見は、構造-活性相関研究による薬物代謝予測や新規医薬品候補物質の設計に有用である。一方で、オーファンP450の結晶構造解析は未だ報告がない。

## 2. 研究の目的

本研究はオーファンP450に属するCYP2U1、CYP4X1、CYP4Z1を対象として下記の2点を明らかにすることを目的とした。

(1) *in vitro* 機能解析・構造解析によるオーファンP450の酵素機能と分子構造学的特性の解明

大腸菌等に発現・精製した3種のオーファンP450組換え酵素の内因性基質及び代謝物を網羅的に探索し、組織内基質濃度及び酵素反応の親和性を考慮し、真の内因性基質とその代謝物を同定する。同定した基質をリガンドとし、各オーファンP450のX線結晶構造解析を行い、酵素の基質特異性を説明しうる

基質結合部位の立体構造上の特徴を見出す。

(2) がん臨床試料を用いたオーファンP450の病態生理学的意義の解明

日本人がん患者より、外科的に切除された各種がんの腫瘍組織及びその周辺の非がん組織を用いて、オーファンP450の発現レベルを定量し、発現量と、腫瘍悪性度、生存率、進行度、治療応答性との関連を明らかにする。*in vitro* 機能解析で明らかになった内因性基質が関与する代謝パスウェイ上のメタボローム解析を行い、腫瘍組織における各オーファンP450の発現レベルが組織内のメタボロームレベルの変動に与える影響を解明する。

本研究では、ヒトゲノム解読後にその存在が明らかになった3種のオーファンP450の酵素活性・発現・構造における特性を解明するのみならず、臨床の腫瘍組織におけるメタボロームレベルを解析し、各オーファンP450の発現変動が、内因性基質と同じパスウェイ上のメタボロームのレベルに及ぼす影響を明確にすることを重要視した。また、他の薬物代謝性のP450と同様に、オーファンP450には遺伝子多型の存在が示唆されるため、日本人を対象とした研究が必要であると考えた。

## 3. 研究の方法

(1) *in vitro* 機能解析・構造解析によるオーファンP450の酵素機能と分子構造学的特性の解明

オーファンP450の大腸菌での発現検討  
CYP2U1については、N末端領域の配列を大腸菌の発現用に2通りに改変し (modification-1及びmodification-2)、C末にHisタグをつけたヒトCYP2U1をコードするcDNAをpCW-LICベクターにサブクローニングした。すでに、CYP2U1とアミノ酸レベルで最も相同性が高い (37.1%) CYP2R1が、本ベクターを用いた大腸菌発現系により大量発現できることが報告されている (Strushkevich et al., J. Mol. Biol. (2008) 380, 95-106)。よって、pCW-LICを発現ベクターとして選択し、ポジティブコントロールとしては、pCW-LICにサブクローニングしたCYP2R1を用いた。宿主大腸菌として、DH5α、Rosseta2、JM109、pGro7/BL21の4種を検討した。

CYP4X1については、N末端領域を改変し、C末にHisタグをつけたヒトCYP4X1をコードするcDNAをHis2-TOPOベクターにサブクローニングし、pGro7/BL21大腸菌にトランスフォーメーションした。同じくpTrecプロモーター下で大腸菌による大量発現の実績があるCYP2C9をポジティブコントロールとして用いた。

CYP4Z1については、cDNA合成時から、本遺伝子の発現が大腸菌の生育に有害であることが明らかになったため、非誘導時には

本遺伝子の転写を完全に制御できる pET システムを用いた。すなわち、N 末端領域を改変し、C 末に His タグをつけたヒト CYP4Z1 をコードする cDNA を pET28a ベクターにサブクローニングし、Rosetta2 (DE3) 大腸菌にトランスフォーメーションした。

各オーファン P450 発現用宿主大腸菌は、適切な抗生物質を含む LB 培地で前培養した後、TB 培地に植菌し OD600 が 0.8~0.9 に達するまで培養した。1mM IPTG にてタンパク発現を誘導した後、 $\delta$ -アミノレブリン酸を 80 mg/L 加えてさらに 30 で 24-66 時間培養を継続し集菌した。オーファン P450 発現量の確認は、大腸菌ピレットをプロテアーゼ阻害剤存在下でリン酸カリウム緩衝液に、懸濁させた後、リゾチーム処理により、細胞壁を分解した。等量の水を加えて、浸透圧ショックを加えた後、さらに 10 分反応させ、遠心にて集菌した。細胞残骸をリン酸カリウム緩衝液で懸濁し、超音波破碎した。遠心にて、可溶性画分を回収し、Absolute spectra 及び CO difference spectra を測定し、発現量を算出した。

オーファン P450 のバキュロウイルススーカイコ発現系での発現検討

バキュロウイルススーカイコ発現系を用いた CYP2U1 の発現はシスメックス株式会社プロキューブサービスに委託した。すなわち、ヒト CYP2U1 全長を含む cDNA をポリヘドリンプロモーター下の pHS04 ベクターにサブクローニングした。組換えウイルスを作製後、蛹に P450 reductase を発現する組換えウイルスと一緒に共発現させ、ヘム構成経路の活性化作業後、感染 6 日目にウイルス感染蛹を回収し破碎した。磨砕物濾液の沈殿画分を懸濁させ、ホモジナイズ、超音波処理を行った上清を超遠心した。沈殿画分を洗浄後、ミクロソーム画分とし、CO difference spectra を測定し、発現量を算出した。

ポジティブコントロールとして用いた CYP2C9 の X 線結晶構造解析

オーファン P450 の発現のポジティブコントロールとして大腸菌に発現させたヒト CYP2C9 は、Ni Affinity クロマトグラフィーに続き、CM セファロースを担体とした陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。精製した CYP2C9 タンパクを抗高血圧薬ロサルタンと反応させた後、濃縮し、結晶化スクリーニングのためのタンパク試料とした。結晶化のための初期条件の検討は、sitting-drop 蒸気拡散法にて行った。放射光による X 線回折実験を行い、2.1 から 2.5 分解能の回折データを取得した。位相の決定はすでに報告のある CYP2C9-フルルピプロフェンとの結合体の構造 (PDB ID:1R9O) を基に分子置換法にて行った。

(2) がん臨床試料を用いたオーファン P450 の病態生理学的意義の解明

ヒト臨床試料の収集

ヒト臨床試料を用いたオーファン P450 の発現解析、メタボローム解析を実施するにあたり、国立医薬品食品衛生研究所、国立がん研究センターの倫理審査委員会による必要な審査及び機関の長の承認を得た。乳がん患者の 25 名 (年齢 34-87 歳、中央値 53 歳) の手術で摘出した腫瘍部、非がん部のペアを測定に供した。

オーファン P450 の mRNA 発現解析

腫瘍部、非がん部の組織、約 50 mg より、RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。cDNA 合成は High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit を用い、プロトコールに従い実施した。mRNA 発現解析は、TaqMan(R) Gene Expression Assays を用いたリアルタイム PCR 法により行った。CYP2U1、CYP4X1 及び CYP4Z1 の発現解析に用いた assay ID はそれぞれ Hs00766273\_m1、Hs00380077\_m1、Hs01045187\_m1 である。補正には内在性コントロール遺伝子である Eukaryotic 18S rRNA (Hs99999901\_s1) を用い、各サンプル間のオーファン P450 の発現量を相対的に比較した。

ヒト臨床試料を用いた脂肪酸代謝物のメタボローム解析

オーファン P450 の内在性基質としては、アラキドン酸、アナンダミド、ラウリン酸等が報告されており、脂肪酸が基質の候補として挙げられる。そこで、腫瘍部、非がん部組織の脂肪酸パスウェイのメタボローム解析を行い、代謝物レベルの変動を確認した。

乳がん組織 (各 10 mg) から、内部標準物質 (IS) 存在下、Bligh & Dyer 法により脂溶性代謝物を抽出した。酸化脂肪酸 (oxidative fatty acids, oxFA) を含む上層を分離し、Oasis HLB Vac RC cartridge (Waters 社) を用いて固相抽出を行い、ギ酸メチル画分を分取し、サンプルとした。超高速液体クロマトグラフ - 三連四重極リニアイオントラップ型質量分析計 (UPLC-MS/MS、高速液体クロマトグラフは Waters 社 ACQUITY UPLC、三連四重極リニアイオントラップ型質量分析計は AB SCIEX 社 QTRAP5500) を用いたネガティブイオンモードでの多重反応モニタリング法にて測定した。UPLC-MS/MS より得られたデータは、MultiQuant ソフトウェア (AB SCIEX 社) を用いて検出された代謝物ピークの面積値を求めた後、IS により補正を行った。

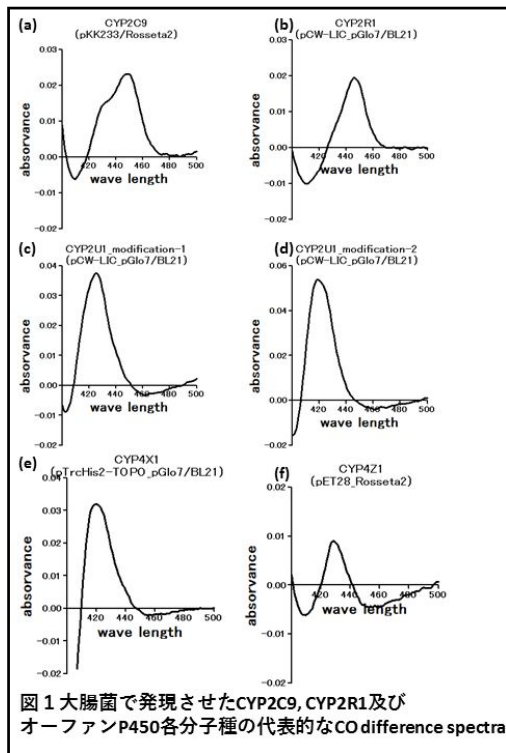
4. 研究成果

(1) *in vitro* 機能解析・構造解析によるオーファン P450 の酵素機能と分子構造学的特

## 性の解明

オーファン P450 の大腸菌での発現検討

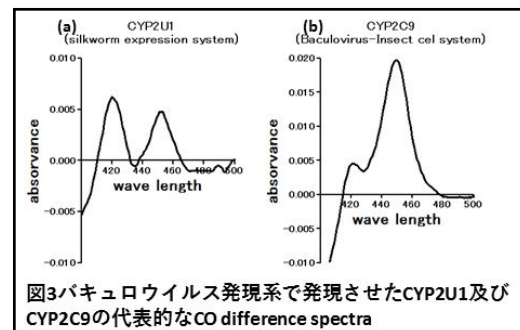
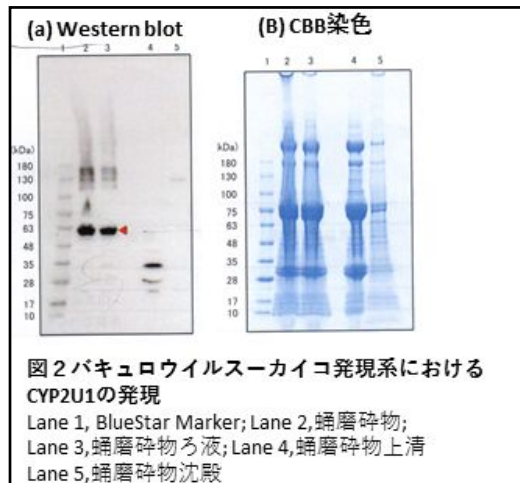
ポジティブコントロールとして用いた CYP2C9, CYP2R1, 及び各オーファン P450, CYP2U1, CYP4X1, CYP4Z1 すべての組換え体において、heme 鉄の Soret band の吸収に基づく Absolute spectra より 500 nmol /L culture 以上の発現を認めた。各分子種の代表的な CO difference spectra を図 1 に示す。CYP2C9 と CYP2R1 は 450nm 付近に吸収極大を示すスペクトルが観察され、活性を有する P450 の発現が観察されたのに対し、CYP2U1, CYP4X1, CYP4Z1 は 420nm 付近に吸収極大を示し、活性を有しない P420 であることが明らかになった。N 末の改変配列を変更 (図 1c 及び図 1d) や大腸菌の宿主の変更、培養時間の変更等を試みたものの、改善は認められず、CYP2U1, CYP4X1, CYP4Z1 を活性の有する P450 として大腸菌で発現させることはできなかった。以上より、大腸菌においてオーファン P450 を発現させるためには、N 末端改変や培養系等にさらなる工夫が必要と考えられた。



オーファン P450 のバキュロウイルス-カイコ発現系での発現検討

蛹磨碎物の SDS-PAGE より、CYP2U1 が発現していることが示された (図 2)。そこで、マイクロソーム画分を分取し、CO difference spectra を測定したところ、450 nm と 420 nm に吸収極大を認め、活性を有するホロ酵素と活性を有しないアポ酵素が同等レベルで存在していた (図 3a)。CYP2U1 ホロ酵素のレベルは、26.9 pmol P450 mg microsome protein であった。マイクロソーム画分より CYP2U1 タンパクを精製するに十分な発現が確保できず、発現量をふやすための条件検

討 (CYP2U1 と P450 reductase の発現比の最適化等) が必要と考えられた。一方で、得られた CYP2U1 のマイクロソーム中の発現は酵素活性を測定するには十分量であり、内在性基質の探索には有効に使用できる。今後、本 CYP2U1 発現マイクロソームを用い、網羅的に内在性基質及びその代謝物を探索する予定である。また、ポジティブコントロールとして用いたバキュロウイルス昆虫細胞系で発現させた CYP2C9 は、450 nm に吸収極大を認め、ほぼホロ酵素として存在していた (図 3b)。



ポジティブコントロールとして用いた CYP2C9 の X 線結晶構造解析

立体構造解析を精密化した結果、結合したロサルタンの明瞭な電子密度が観測された。CYP2C9 1 分子あたり、ロサルタン 3 分子の結合が認められ、1 分子は活性中心に位置し、もう 1 分子は活性中心からは離れた部位で P227 から T229 残基がその結合に関与していた。3 分子目のロサルタンは基質のアクセスチャンネルに結合しており、SRS5 (substrate recognition site5) 及び SRS6 のアミノ酸が結合に関与していた。R108 及び N204 と静電的相互作用をしていた活性中心のロサルタンは、その酸化部位がヘム鉄とは反対側に向いており、非生産的な結合が優位であることが示された。

(2) がん臨床試料を用いたオーファン P450 の病態生理学的意義の解明

### オーファン P450 の mRNA 発現解析

25 名の乳がん患者の腫瘍部、非がん部における CYP2U1、CYP4X1、CYP4Z1 の相対発現量を図 4 に示す。CYP2U1 は、すべての症例で非がん部と比較して腫瘍部において発現量が減少していた。一方、CYP4X1 及び CYP4Z1 は数症例において非がん部と比較して腫瘍部で発現の顕著な増大 (CYP4X1 は最大で 11 倍、CYP4Z1 は最大で 27 倍) を認めた。現在、オーファン P450 発現量と患者臨床情報との相関解析を行っており、オーファン P450 の高発現患者における臨床的特徴を明らかにする予定である。

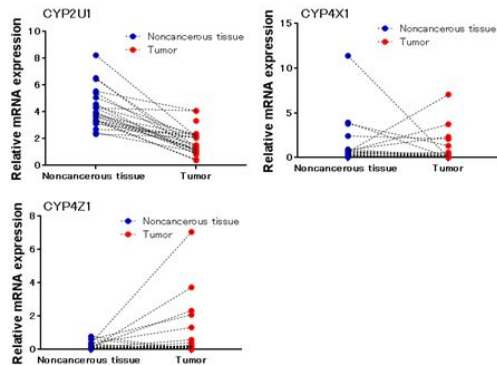


図4 乳がん組織の非がん部、腫瘍部におけるオーファンP450 mRNAの発現

### ヒト臨床試料を用いた脂肪酸代謝物のメタボローム解析

乳がん組織より、45 種の脂肪酸代謝物が検出され、そのうち 11 種が腫瘍部において隣接する非がん部より有意にレベルが高かった。有意差を認めた代謝物は、アラキドン酸、Prostaglandin D<sub>2</sub>、18-HETE (18-hydroxy-eicosatetraenoic acid) 等であった (図 5)。現在、脂肪酸代謝物レベルとオーファン P450 mRNA 発現量との間の相関を解析しており、数種の代謝物と発現量との間に有意な相関を見出している。

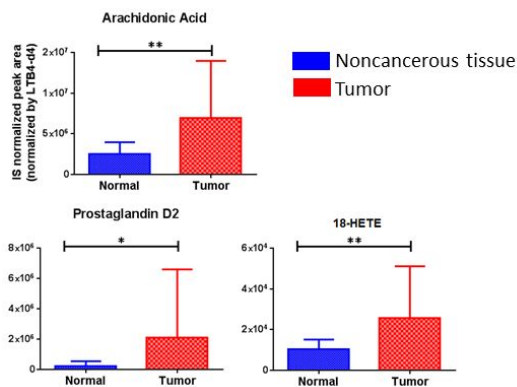


図5 乳がん組織の非がん部、腫瘍部における脂肪酸代謝物のメタボローム解析

### (3) まとめ

本研究ではオーファン P450 に分類される CYP2U1、CYP4X1、CYP4Z1 の脱オーファン化を目的に、酵素機能・分子構造学的特性の解明

及び病態生理学的意義の解明を目指した。

酵素機能・分子構造学的特性の解明に関しては、大腸菌において、活性を有する P450 を発現することができず、研究が遅れたが、その過程で CYP4Z1 の発現が大腸菌に毒性を示すことが明らかになり、本酵素機能を考える上で興味深い。一方、バキュロウイルス-カイコ発現系で発現した CYP2U1 に関しては、その内因性基質の探索が今後の課題である。

ヒト臨床試料を用いた病態生理学的意義の解明に関しては、日本人の乳がん患者の腫瘍部において CYP4Z1 が高発現している症例が見出され、海外での報告と一致する。臨床情報との関連解析を継続し、高発現患者における臨床的特徴を明らかにする予定である。さらにメタボローム解析により乳がんの腫瘍部で非がん部と比較してレベルが高い代謝物が見出され、一部の代謝物がオーファン P450 の mRNA の発現と相関することを見出している。これらの代謝物はオーファン P450 の代謝物である可能性も考えられ、今後、*in vitro* の発現系により検証する必要がある。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) Adachi M, Matsuzawa Y, Kuroki R, Saito Y and Maekawa K. Crystal structure analysis of human drug metabolizing enzyme CYP2C9 complexed with medicinal compound Losartan. Photon Factory Activity Report 2015 #33 (2016) B. [http://pfwww.kek.jp/acr/2015pdf/part\\_b/pf15b0364.pdf](http://pfwww.kek.jp/acr/2015pdf/part_b/pf15b0364.pdf)
- (2) 前川京子, 佐井君江: 薬物相互作用に影響を及ぼす遺伝子多型とその人種差. ファルマシア 2014;50:669-73. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/faruawpsj/50/7/50\\_669/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/faruawpsj/50/7/50_669/_pdf)
- (3) Okemoto K, Maekawa K, Tajima Y, Tohkin M, Saito Y.: Cross-Classification of Human Urinary Lipidome by Sex, Age, and Body Mass Index. PLoS One. 2016 Dec 14;11(12):e0168188. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5156423/pdf/pone.0168188.pdf>

〔学会発表〕(計 8 件)

- (1) 前川京子, 石川将己, 妹尾勇弥, 田島陽子, 齊藤公亮, 浦田政世, 村山真由子, 熊谷雄治, 齋藤嘉朗: バイオマーカー探索・検証のためのヒト血液中脂質代謝物レベルに関する網羅的検討. 日本薬物動態学会第 28 回年会 (2013.10.10, タワーホール船堀)

- (2) 安達基泰, 前川京子, 松澤由美子, 齋藤嘉朗, 黒木良太: X線結晶回折法によるヒト由来薬物代謝酵素 CYP2C9 および一塩基置換体(\*30)と抗高血圧薬ロサルタンの相互作用解析. 第14回日本蛋白質科学会年会(2014.6.25-27, ワークピア横浜)
- (3) Maekawa K, Saito K, Ishikawa M, Minamino M, Kumagai Y, Saito Y.: Metabolomic biomarker exploration highlights issues of species specificity. KSCPT-JSCPT Joint symposium (2014.11.14, Busan, Korea)
- (4) Maekawa K, Matsuzawa Y, Adachi M, Kuroki R, Saito Y: Purification of cytochrome P450 2C9.1, 2C9.3 and 2C9.30 expressed in E. coli and their activities toward arachidonic acid in vitro. 19th ICCP450 2015 (2015.6.12-15, 国立オリンピック記念青少年総合センター)
- (5) 安達基泰, 黒木良太, 前川京子, 松澤由美子, 齋藤嘉朗: ヒト由来薬物代謝酵素 CYP2C9 の一塩基置換体(\*3 及び\*30)と抗高血圧薬ロサルタンとの複合体の X 線結晶構造解析. 第38回分子生物学会年会・第88回生化学会大会合同大会 BMB2015 (2015.12.1-4, 神戸ポートアイランド)
- (6) 前川京子, 松澤由美子, 齋藤嘉朗, 谷内田真一: 日本人乳がん患者の腫瘍部, 及び非がん部におけるオーファン P450 mRNA 発現量と酸化脂肪酸代謝物レベル. 第89回日本薬理学会年会(2016.3.9-11, パシフィコ横浜)
- (7) Maekawa K, Adachi M, Matsuzawa Y, Kuroki R, Saito Y, Shah M. Crystal Structures of CYP2C9, CYP2C9\*3 and CYP2C9\*30 in Complex with Multiple Losartan Molecules Reveal a Peripheral Binding Site and Alternate Active Site Orientations. MDO2016 (2016.10.2-6, California, USA)

〔その他〕

ホームページ等

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前川 京子 (MAEKAWA, Keiko)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・室長

研究者番号: 70270626

### (2) 研究分担者

安達 基泰 (ADACHI, Motoyasu)

国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構・東海量子ビーム応用研究センター・上席研究員

研究者番号: 60293958

### (3) 研究分担者

谷内田 真一 (YACHIDA, Shinichi)

独立行政法人国立がん研究センター研究所・難治がん研究分野・ユニット長

研究者番号: 20359920

### (4) 研究分担者

齋藤嘉朗 (SAITO, Yoshiro)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・部長

研究者番号: 50215571