

日本人健康成人におけるCathepsin Aの遺伝子多型解析と発現量及び代謝活性への影響評価

伊東, 惣一郎

<https://hdl.handle.net/2324/2534400>

出版情報 : Kyushu University, 2019, 博士 (創薬科学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏 名 : 伊東 惣一郎

論文題名 : 日本人健康成人における Cathepsin A の遺伝子多型解析と発現量及び代謝活性への影響評価

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

医薬品開発においてプロドラッグは非常に必要な役割を担ってきた。2008年から2017年の10年間においてもFDAに承認された医薬品249品目のうち31品目、つまり約10%がプロドラッグであった。その数は2016年を除き毎年ほぼ2品目が承認されている。プロドラッグは代謝されることによって薬理活性をもった活性体となる。その代謝活性化に関与する代謝酵素はカルボキシエステラーゼを代表として数多く知られており、薬物の適正使用という観点で、それらの代謝酵素の遺伝子多型が薬物代謝酵素にどのような影響を及ぼすのかは非常に重要である。

近年、Cathepsin AがHIVの抗レトロウイルス療法やB型肝炎治療薬として使用されるテノホビルアラフェナミド (TAF/GS-7340, 2016年7月販売開始)及びC型肝炎の直接作用型抗ウイルス薬治療で用いられるソホスブビル (SOF/GS-7977/PSI-7977, 2015年5月販売開始)といったプロドラッグの代謝活性化に重要な役割を担っていることが明らかとなっており、Cathepsin Aの薬物代謝酵素としての医薬品研究開発や医薬品の適正使用の面で重要性が認識されつつある。本研究では薬物代謝酵素であるCathepsin Aの日本人健康成人における遺伝子多型解析を実施し、同定された遺伝子多型が転写活性、シグナルペプチド切断部位、蛋白発現及び薬物代謝活性へ及ぼす影響を確認した。

Cathepsin A 遺伝子には3つの transcript variant 1-3が報告 (GenBank database) されておりTAFの薬効発現部位であるヒトリンパ球にはどの variant が主に発現しているかは不明であった。そこで日本人健康成人の血液中のリンパ球に発現している Cathepsin A の転写産物の同定を行った結果、ヒトリンパ球における Cathepsin A の主要な転写産物は variant 1, 2 であり variant 3 の発現量はそれらに比べて著しく低いことが示唆された。その情報を踏まえて Cathepsin A 遺伝子の網羅的な解析を行った結果、遺伝子多型は9種類同定されいずれも蛋白質の発現量に関わる可能性のある部位であった。その多型の中で Cathepsin A 遺伝子の 5' flanking region (FLR)で認められた3種の多型 (-322G>A, -223G>A, -43G>T) は、これまでの研究でその領域が Cathepsin A 遺伝子の転写活性に重要である可能性が示唆されたことから転写活性に対する多型の影響を確認した。しかしながら各遺伝子型間で転写活性に有意な差は認められず Cathepsin A 遺伝子転写活性化にはこれら遺伝子多型は影響を与えないと考えられた。

今回の多型解析で唯一アミノ酸配列に影響を及ぼし日本人において非常に高いアレル割合を示した exon 2 の多型 (85_87 CTG>-) は signal peptide 領域に位置しロイシンの欠落をともないロイシン 9 回反復配列が 8 回反復配列となる。この変異について蛋白発現及び薬物代謝活性への影響を確認した結果, variant 2 の蛋白発現量が遺伝子多型によって有意に増加し, 薬物代謝活性も蛋白発現量に応じて有意に高い値を示した。一方でその他の variant については遺伝子多型による有意な影響は認められなかった。Leu8 多型が存在する Leu リピートは signal peptide 中の疎水性コアに位置しており, signal peptide N 末配列の長さや Leu リピート個数の変化が小胞体への輸送効率に影響を及ぼすという報告が他の遺伝子においても多くあることから, Cathepsin A 遺伝子における Leu リピート個数の変化が Cathepsin A の小胞体への輸送効率に影響し, 成熟体発現量の違いを引き起こした可能性がある。また variant 1, 2 の成熟体は野生型 (Leu9) 及び多型 (Leu8) のいずれにおいても, variant 2 でより高い発現傾向であった。その理由として variant 1 の signal peptide は 46 アミノ酸に対して variant 2 の signal peptide は 28 アミノ酸と短いことが小胞体への輸送効率に影響し, 成熟体発現量の違いを引き起こした可能性が考えられた。一方, Cathepsin A 前駆体では各 variant で遺伝子多型の有意な影響は認められなかった。前駆体は variant 3 で最も強く発現しており, variant 1 と比較して発現量が有意に上昇した。Variant 3 は成熟体においてその発現をほとんど認めなかったことと併せて考えると, variant 3 は Cathepsin A 前駆体から成熟体への移行が進んでいないことが示唆された。この成熟体の未生成は TAF を用いた代謝活性が認められなかった結果とも一致した。Variant 3 は, variant 1, 2 と遺伝子構造が全く異なっており, exon 4 が欠損している。Exon 4 領域は Cathepsin A 二量体形成時に β -ガラクトシダーゼと相互作用する部位であると示唆されており, Cathepsin A 活性に寄与する可能性があると考えられ, 今後, 同領域の機能的重要性についての検討が必要である。

本研究では, 日本人健康成人における Cathepsin A 遺伝子の網羅的な解析によって遺伝子多型を同定し, その多型が機能に及ぼす影響を明らかにした。5' FLR 及び全ての exon 領域の遺伝子解析を行った結果, 遺伝子発現や蛋白発現に関わる領域に 9 種類の遺伝子多型が同定された。その中で唯一 exon 2 の多型 (85_87 CTG>-) がアミノ酸配列に影響を及ぼし Leu9 が Leu8 となった。この多型は日本人においてホモ型の割合が非常に高く, 野生型と比較して Cathepsin A 成熟体の蛋白発現量が上昇し, TAF 代謝活性の増大を引き起こす可能性が示唆された。Cathepsin A 以外の蛋白質でも多型による Leu リピート数の変化が蛋白発現や機能に影響を及ぼすことが複数報告されていることも踏まえ, 今後, 臨床において Leu8 多型により HIV 治療薬 TAF の活性発現臓器 (白血球) における Cathepsin A 蛋白発現量がどの程度変化し薬物の体内動態や薬効へのどのような影響を与えるか確認していくことが重要である。また, その際に本研究で構築した従来法よりも測定時間を約 4 分の 1 に短縮したスループットの高い TFV-Ala 測定系も速やかに知見を取得する上で非常に有用である。これら薬物代謝酵素 Cathepsin A の遺伝子多型に関する知見は, 今後の医薬品の適正使用及び迅速な医薬品開発の一助となることが期待される。