

研究報告書
平成29年度：A課題

平成31年4月4日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 東北大学大学院薬学研究科

住 所 〒980-8578
仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3

研究者氏名 平塚 真弘



(研究課題)

フッ化ピリミジン系抗がん剤の副作用予測を目指した代謝酵素レアバリアントの網羅的機能解析

平成30年1月24日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

PH.D. THESIS



THE UNIVERSITY OF CHICAGO

PH.D. THESIS

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

PH.D. THESIS

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

PH.D. THESIS

平塚 真弘

東北大学大学院薬学研究科・東北大学病院 准教授

研究課題名：フッ化ピリミジン系抗がん剤の副作用予測を目指した代謝酵素レアバリエントの網羅的機能解析

研究内容

5-フルオロウラシル (5-FU) を代表するフッ化ピリミジン系抗がん剤は、主に固形がんの治療に用いられている。しかし、投与患者の約 10~30%に重篤な副作用が発現するため、治療が中断されるケースや患者が死亡するケースも少なくない。私たちは最近、大腸癌の術後補助療法として 5-FU 系抗がん剤を投与した患者が重篤副作用を呈した症例において、5-FU の二次代謝酵素ジヒドロピリミジナーゼ (DPYS) の遺伝的酵素欠損を疑い、酵素活性が完全に消失する原因となる遺伝子多型を 2 カ所同定した。5-FU の体内分解を触媒する酵素のアミノ酸置換等を伴ったバリエントの機能変化解析は、副作用発現の予測精度を向上させる上で極めて重要な研究となる。本研究では、日本人 3554 人の全ゲノム解析から明らかになった DPYS の希少頻度多型 (レアバリエント) 情報を基に、12 種の組換え酵素タンパク質を作製し、野生型酵素と比較して活性がどの程度低下するかを網羅的に明らかにした。また、酵素活性が低下または消失するメカニズムについて、多量体形成能、タンパク安定性、および 3D シミュレーションモデルの観点から解析した。

方法

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構が構築した 3554 人の日本人全ゲノム解析データから抽出した 12 種のレアバリエントに基づく発現ベクターを作製し、293FT 細胞にトランスフェクションすることでバリエント酵素を調製した。各酵素に特異的基質であるジヒドロフルオロウラシルを様々な濃度で一定時間反応させ、代謝物の生成量を LC-MS/MS により定量し、酵素反応速度論的パラメータ K_m 、 V_{max} および固有クリアランス (CL_{int}) を算出した。多量体形成能は Native-PAGE により解析し、タンパク安定性に関してはタンパク翻訳阻害剤やプロテアソーム阻害剤の添加によりそのメカニズムを解析した。また、3D シミュレーションモデルを用いてアミノ酸置換による構造変化を解析した。

結果

1) 酵素反応速度論的解析

4 種において酵素活性が完全に消失した。1 種で CL_{int} が野生型の約 5%まで大幅に低下し、4 種において 70%前後まで低下した。3 種は野生型と同等の酵素活性を示した。

2) 酵素活性変化のメカニズム

Native-PAGE で多量体と考えられるバンドについて、酵素活性が消失した 4 種と CL_{int} が大幅に低下した 1 種において確認されなかった。タンパク安定性に関しては、酵素活性が消失した 2 種において、タンパク翻訳阻害剤添加によるタンパク量低下を示した。うち 1 種では、プロテアソーム阻害剤添加によるタンパク量増加を確認した。3D シミュレーションモデルでは、酵素活性が低下または消失したバリエントについて、多量体形成に関わる部位または基質固定部位における構造変化を示した。

考察

5 種の DPYS レアバリエントで酵素活性が消失または大幅に低下した。これらのバリエントを持つ 5-FU 投与患者では、重篤な副作用を発現する可能性があると考えられた。また、酵素活性が低下または消失するメカニズムとして、多量体形成能の有無が重要であり、酵素活性を示すためには多量体形成が必要であると考えられた。さらに、タンパク安定性の低下もメカニズムの 1 つとして考えられた。1 種についてプロテアソーム系の関与を明らかにしたが、他の 1 種で関与が推測されるオートファジー系についても評価する必要がある。3D シミュレーションモデルにおける解析では、アミノ酸置換に伴う構造変化によって、多量体形成または活性部位への基質の固定に影響が生じることが考えられた。