

研究課題名

In silico 及び *in vitro* 解析によるヒトチトクローム P450 を介したポリ塩化ビフェニルの代謝能評価

共同研究者名

平川 周作 (代表、福岡県保健環境研究所)
梶原 淳睦 (分担、福岡県保健環境研究所)
堀 就英 (分担、福岡県保健環境研究所)
宮脇 崇 (分担、福岡県保健環境研究所)
芳之内 結加 (分担、愛媛大学沿岸環境科学研究センター)
岩田 久人 (拠点構成員、愛媛大学沿岸環境科学研究センター)
野見山 桂 (拠点構成員、愛媛大学沿岸環境科学研究センター)

研究目的

本共同研究プロジェクトでは、ヒトのチトクローム P450 (CYP) 分子種を介したポリ塩化ビフェニル (PCB) の代謝の特徴を *in silico* 及び *in vitro* 解析を用いて調査した。

1968 年、福岡県を含む西日本地域において、米ぬか油への PCB やダイオキシン類の混入による油症事件が発生した。事件後約 50 年が経過した現在でも、油症患者の体内には、高濃度の PCB 及びダイオキシン類が残留していることが明らかになっている。一方、2000 年代に検診で採取した血液中の PCB 蓄積パターンを解析した結果、油症患者では一般人と比べて低塩素化 PCB が優先的に代謝されていることが推察された。また、これまでの LaMer 共同研究プロジェクトにおいて、*in silico* 解析を用いて PCB 異性体 (69 種) とヒト CYP 分子種 (7 種) のドッキング様式をシミュレーションした結果、ダイオキシン類に誘導される CYP 分子種が PCB 異性体を代謝しやすいドッキング様式をとることが示唆されている。

平成 30 年度の共同研究では、*in silico* 解析を用いて PCB 異性体とのドッキング様式のシミュレーション結果を詳細に解析することで代謝産物として生成される水酸化 PCB の形態を予測し、最短距離のデータと統

合して代謝能の評価を行った。さらに、シミュレーションで予測した PCB の代謝反応が実際に起こり得るかを確認する予備検討として、ヒト CYP2A6 組換え酵素を用いて、代謝物の生成が予測される HxCB153 及び代謝が困難と考えられる HxCB156 の *in vitro* 試験を実施し、生成された水酸化 PCB の測定を試みた。

研究内容

【PCB-CYP ドッキングシミュレーションによる水酸化 PCB の形態予測】

これまでの共同研究プロジェクトにより、愛媛大学沿岸環境科学研究センター化学汚染・毒性解析部門の岩田研究室が所有している分子シミュレーションソフトウェア Molecular Operating Environment (MOE) プログラムを利用し、69 種類の PCB 異性体とヒト CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C9、CYP3A4 のドッキング様式に関するシミュレーションを実施してきた。CYP の活性中心にあるヘム鉄と基質の標的部位の距離が 5Å (または 6Å) 以内にある場合、効率的に代謝されるとの報告がある。そのため、PCB 異性体の塩素が結合していない炭素原子を標的部位として、CYP のヘム鉄と標的部位の最短距離を測定し、距離に重点を置いて代謝能の有無の評価基準とした。なお、一对の CYP と化合物の組み合わせでドッキング様式をシミュレーションすると 5 ~ 9 パターンの結果が得られるため、全てのパターンで標的部位との最短距離を測定し、その中で最も短い距離になるものを「最短距離」として採用している。一方、PCB 異性体の標的部位を詳細に解析することにより、PCB の代謝によって生成される水酸化 PCB の種類や関与する CYP 分子種の予測が可能と考えられることから、平成 29 年度から標的部位の情報を獲得するため、詳細解析を実施してきた。

本年度の共同研究により、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C9、CYP3A4 の 7 分子種とヒトの血液中から検出された 69 種類の PCB 異性体について、最短距離と標的部位の情報を揃えることができた。そこで、各 PCB 異性体に対する CYP 分子種の代謝能を評価するため、①標的部位とヘム鉄の最短距離 (<5Å)、②標的部位とヘム鉄の全パターン

の最短距離の平均値 ($< 5 \text{ \AA}$)、③標的部位から推測される水酸化 PCB の検出事例の有無を調査し、取りまとめた。

【CYP2A6 による PCB 異性体の *in vitro* 試験と水酸化 PCB の測定】

市販されているヒト CYP2A6 組換え酵素 (Human CYP2A6 + P450 Reductase + Cytochrome b₅, CORNING) を使用し、シミュレーションで予測した PCB の代謝反応が実際に起こり得るかを確認する予備検討を実施した。検討には、代謝物の生成が予測される HxCB153 及び代謝が困難と考えられる HxCB156 を用いた。*In vitro* 試験と水酸化 PCB の測定は、化学汚染・毒性解析部門の野見山准教授のもとで実施した。

10 mL 試験管に Mix PCB バッファー (100 mM リン酸バッファー pH 7.4, 5 mM MgCl₂)、0.55 μM PCB 異性体、80 nM CYP2A6 を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間プレインキュベートした。続いて、NADPH regenerating system (フナコシ) を加えて代謝反応を開始させ、37 $^{\circ}\text{C}$ で 180 分間インキュベートした。氷冷メタノールを 1 mL 添加することにより、反応を停止させた。

In vitro 試験後の反応液について、PCB 及び生成した水酸化 PCB を測定するため、下記の通り前処理を実施した。試験管内の代謝試験反応液にクリーンアップスパイクを添加した後、1+1 HCl を 2 mL、2-propanol を 1 mL、50% methyl tert-butyl ether (MTBE)/hexane を 2 mL 加え、ボルテックスにて 1 分間攪拌した後、遠心分離し、有機層を分取した (繰り返し 3 回)。抽出液に 10% NaCl を 2 mL 加え、1 回の天地逆転で混合後、30 分間静置し、下層の夾雑層を除き、2 mL まで窒素気流下で濃縮した。1 M KOH (50% ethanol/Hexane 洗浄水) を 2 mL 濃縮した抽出液に加え、1 分間攪拌し、PCB を含む有機層と水酸化 PCBs を含む KOH 層に分配した (繰り返し 2 回)。KOH 層に濃硫酸を数滴加えて pH 2 以下にし、50% MTBE/hexane を 2 mL 加え、攪拌して水酸化 PCBs をヘキサンに転溶し、上層の有機層を分取した (繰り返し 3 回)。分取した溶液を窒素気流下で 1 mL まで濃縮した後、メタノールを 250 μL 、ジクロロメタンを 250 μL 、trimethylsilyldiazomethane を 150 μL 加え、一晩静置して水酸化 PCBs を CH₃O-PCBs に誘導体化した。その後、3 g の活性化シリカゲルカラムクロマトグラフィー (Wako-gel S-1) によりクリーンアップし、140 mL の

10% DCM/hexane を用いて CH₃O-PCBs を溶出し、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮後、濃縮管に分取した。シリンジスパイクを添加、窒素気流下で 50 μL まで濃縮したものを最終溶液とし、HRGC-HRMS を用いて測定した。

また、KOH 分配後の有機層には PCB が含まれている。親 PCB の減量を確認するため、4 g の活性化シリカゲルカラムクロマトグラフィー (Wako-gel DX) に供してクリーンアップした。110 mL の 5% DCM/hexane を用いて PCBs を溶出し、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮後、濃縮管に分取した。シリンジスパイクを添加、窒素気流下で 50 μL まで濃縮したものを最終溶液とし、GC-MS を用いて測定した。

研究成果

平成 30 年度の共同研究では、69 種の PCB 異性体に対する 7 種の CYP 分子種の代謝能を評価するため、PCB-CYP のドッキング様式を詳細に解析することにより、①標的部位とヘム鉄の最短距離、②標的部位とヘム鉄の全パターンでの最短距離の平均値、③標的部位から推測される水酸化 PCB の検出事例の有無を調査し、Table 1 に取りまとめた。①～③の評価項目のあてはまりが多いほど、代謝能を有する可能性が高いと考えられる。特に、CYP2A6 や CYP2B6 は評価項目のあてはまりが多い異性体が多く、次いで CYP1A1 が PCB の代謝への寄与が高いと推察された。また、シミュレーションによるドッキング様式の解析により、水酸化 PCB と親 PCB を結ぶ代謝経路に関わる CYP 分子種を推定することができた。一方、水酸化 PCB の検出事例については、血液中で検出されたものをまとめた Grimm *et al.* (Crit. Rev. Toxicol. 2015) のレビューを参考にした。しかし、血液中に移行しやすい水酸化 PCB はレビューに記載されているものの、生体内には肝臓で代謝されるが血中に移行しにくい異性体も存在すると考えられる。特に、低塩素 PCB が親化合物と考えられる水酸化 PCB は報告例が少ないものの、代謝されやすいドッキング様式を示すことや油症患者と一般人の濃度比較から誘導された CYP 分子種によって代謝されやすいことが推察されるため、代謝の可能性を注視していきたい。

Table 1 The evaluation of metabolic capacity via CYP isozymes of PCB congeners by in silico analysis

PCB congeners	CYP1A1			CYP1A2			CYP1B1			CYP2A6			CYP2B6			CYP2C9			CYP3A4		
	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③	①	②	③
244'-TrCB(#28)	○									○	○		○	○							
22'35'-TeCB(#44)	○	○					○	○		○	○		○	○				○			
22'44'-TeCB(#47)	○			○			○	○		○	○		○	○							
22'45'-TeCB(#49)	○			○			○			○	○		○	○				○			
22'55'-TeCB(#52)	○			○						○	○		○	○				○			
233'4'-TeCB(#56)	○			○						○	○		○	○							
2344'TeCB(#60)										○	○		○	○							
234'5'-TeCB(#63)										○	○		○	○							
23'44'-TeCB(#66)	○									○	○		○	○							
23'4'5'-TeCB(#70)										○	○		○	○							
23'4'6'-TeCB(#71)	○						○			○	○		○	○							
244'5'-TeCB(#74)										○	○		○	○							
22'344'-PeCB(#85)	○			○		○				○	○	○	○	○							
22'345'-PeCB(#87)	○						○			○	○		○	○							
22'355'-PeCB(#92)	○	○		○	○		○			○	○		○	○							
22'35'6'-PeCB(#95)	○			○			○			○	○		○	○				○			
22'44'5'-PeCB(#99)							○	○	○	○	○		○	○				○			
22'455'-PeCB(#101)	○		○							○	○		○	○				○		○	
233'44'-PeCB(#105)	○		○							○	○		○	○							
233'4'5'-PeCB(#107)										○	○		○	○							
233'4'6'-PeCB(#110)										○	○		○	○							
2344'5'-PeCB(#114)							○						○	○							
234'56'-PeCB(#117)										○	○		○	○							
23'44'5'-PeCB(#118)	○		○							○	○		○	○							
2'344'5'-PeCB(#123)										○	○		○	○							○
22'33'44'-HxCB(#128)				○		○	○		○	○	○		○	○							
22'33'45'-HxCB(#130)				○			○			○	○		○	○							
22'33'46'-HxCB(#132)	○			○						○	○		○	○							
22'33'56'-HxCB(#134)	○	○					○			○	○		○	○							
22'33'56'-HxCB(#135)	○	○		○						○	○		○	○							
22'344'5'-HxCB(#137)							○			○	○		○	○							
22'344'5'-HxCB(#138)	○		○							○	○		○	○				○			
22'344'6'-HxCB(#139)	○			○			○	○		○	○		○	○							
22'3455'-HxCB(#141)	○			○	○					○	○		○	○							
22'34'55'-HxCB(#146)				○			○			○	○		○	○				○			
22'34'56'-HxCB(#147)	○			○			○	○		○	○		○	○							
22'34'5'6'-HxCB(#149)				○			○	○		○	○		○	○							
22'355'6'-HxCB(#151)	○	○		○	○		○	○		○	○		○	○							
22'44'55'-HxCB(#153)	○			○			○	○		○	○		○	○				○			
233'44'5'-HxCB(#156)	○									○	○		○	○							
233'44'5'-HxCB(#157)										○	○		○	○							
233'4'5'6'-HxCB(#164)	○						○			○	○		○	○							
23'44'55'-HxCB(#167)										○	○		○	○							
22'33'44'5'-HpCB(#170)										○	○		○	○							
22'33'455'-HpCB(#172)	○		○				○		○	○			○	○							
22'33'4'56'-HpCB(#177)							○		○	○			○	○							
22'33'55'6'-HpCB(#178)	○			○			○	○		○	○		○	○							
22'33'566'-HpCB(#179)	○			○			○	○		○	○		○	○							
22'344'55'-HpCB(#180)	○		○	○		○				○	○		○	○				○			
22'344'56'-HpCB(#181)	○			○			○			○	○		○	○							
22'344'56'-HpCB(#182)	○	○	○	○		○	○	○		○	○		○	○							
22'344'5'6'-HpCB(#183)	○	○	○	○		○				○	○		○	○							
22'34'55'6'-HpCB(#187)										○	○		○	○							
233'44'55'-HpCB(#189)										○	○		○	○							
233'44'5'6'-HpCB(#191)	○		○				○		○	○			○	○							
22'33'44'55'-OcCB(#194)	○						○			○	○		○	○							
22'33'44'56'-OcCB(#195)	○		○							○	○		○	○							
22'33'44'56'-OcCB(#196)	○			○			○	○		○	○		○	○							
22'33'455'6'-OcCB(#198)	○	○	○	○		○	○	○		○	○		○	○							
22'33'455'6'-OcCB(#199)	○						○			○	○		○	○							
22'33'45'66'-OcCB(#201)	○						○		○	○			○	○							
22'33'55'66'-OcCB(#202)	○	○	○							○	○		○	○							
22'344'55'6'-OcCB(#203)	○	○	○							○	○		○	○							
22'344'566'-OcCB(#204)	○			○			○	○					○	○							
233'44'55'6'-OcCB(#205)	○		○				○	○		○	○		○	○							
22'33'44'55'6'-NoCB(#206)	○									○	○		○	○							
22'33'44'566'-NoCB(#207)	○		○				○	○		○	○		○	○							
22'33'455'66'-NoCB(#208)	○		○				○	○		○	○		○	○							
22'33'44'55'66'-DeCB(#209)	○									○	○		○	○							

① Minimum of the shortest distance of target site among all the docking poses (○: within 5Å)
 ② Average value of the shortest distances of target site in all the docking poses (○: within 5Å)
 ③ Reported as a parent compounds of OH-PCBs in the review by Grimm et al., 2015 (○: reported)

次に、*in vitro* 試験により、CYP2A6 を介した HxCB153 及び HxCB156 の代謝を調査した。その結果、ドッキング様式から代謝が困難と推察されていた HxCB156 では、代謝物の生成が確認されなかった。一方、代謝の可能性が示唆されていた HxCB153 において、4'-OH-CB101 の生成が認められた。ドッキング様式のシミュレーション結果から予測される標的部位を考慮すると、3' 位を標的部位とした 3',4'-epoxide 体の生成に引き続き、4' 位の塩素が脱離して 4'-OH-CB101 に代謝された可能性が高い。Mise *et al.* (Toxicol. Sci. 2016) の報告でも、PeCB118 の代謝物として 5-OH-CB66 が検出されており、脱塩素化した水酸化 PCB の生成反応は起こり得ると考えられる。しかし、HxCB153 から 4'-OH-CB101 が生成される経路については知見が乏しく、また、*in vitro* 試験の再現性は確認できていない。

今後の課題

これまでに実施した共同研究により、CYP 分子種と PCB のドッキング様式のシミュレーションから、各 PCB 異性体の代謝能を有する CYP 分子種を推定することができた。また、単一の CYP 分子種と PCB 異性体を用いた *in vitro* 試験により、代謝の反応経路の確認のために利用することが示唆された。

今後、研究を進展させるために取り組む課題は、下記の通りである。

1. PCB 異性体の代謝標的部位及び最短距離に関するシミュレーションの解析結果と基質の化学的特性等の要因を統合し、ヒトの体内で代謝されやすい異性体の特徴と CYP 分子種との関係を明らかにし、油症患者におけるこれら物質の蓄積特性を解明する。
2. CYP 分子種と PCB 異性体を *in vitro* 系で反応させ、生成される水酸化 PCB を測定し、シミュレーションの結果と統合することで代謝経路の予測を試みる。特に、油症患者で特異的に濃度が高いとされる水酸化 PCB の生成に関与する CYP 分子種を明らかにする。

これらの研究を通して、油症患者における PCB やダイオキシン類の代謝・排泄に関連した治療に寄与していきたい。