

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 2A6 を介した 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl 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)
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)
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)
水川 葉月 (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

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。申請代表者の所属機関は、検診において油症患者の血液中の PCB 及びダイオキシン類の測定を実施しており、現在でも、油症患者の体内にはこれらの化学物質が高濃度に残留していることが明らかになっている。これまでに実施した LaMer 共同研究プロジェクトにおいて、ヒトの血液中から検出される PCB 異性体 (69 種) とヒトチトクローム P450 (CYP) 分子種 (7 種) のドッキング様式を *in silico* 解析でシミュレーションした結果、CYP2A6 及び CYP2B6 分子種が多く PCB 異性体に対して代謝しやすいドッキング様式をとることが示されている。

本共同研究プロジェクトでは、一般人と比較して油症患者の血液中で低い蓄積パターンを示す 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (CB118) について、ヒト CYP2A6 分子種を介した代謝を *in silico* 及び *in vitro* 解析により調査する予定であった。しかし、新型コロナウイルス感染拡大により、愛媛大学に往訪して *in vitro* 試験を実施することが困難となったため、2020 年度は、*in silico* によるヒト CYP 分子種と PCB 異性体のドッキング様式のシミュレーションから得られたデータを用い、統計分析により油症患

者血液中認められる PCB 異性体の特徴的な蓄積パターンに影響を与える因子を解析した。

研究内容

●2019 年度までに取得済みの解析データ

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、PCB 異性体とヒト CYP 分子種のドッキングに関する *in silico* 解析を実施した。PCB 異性体は Accelrys Draw 4.1 で構造式を作成し、それぞれ MOE を用いてシミュレーションに必要な前処理を行い、MOE の分子特性計算機能を利用して化学特性情報を取得した。また、PCB-CYP ドッキングシミュレーションでは、CYP の活性中心にあるヘム鉄と基質の代謝標的部位の距離が 5Å 以内にある場合、効率的に代謝されるとの報告があるため、塩素が結合していない炭素原子を代謝標的部位として、ヘム鉄との最短距離を測定することにより、代謝の可能性を調査した。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、全てのパターンで最短距離を測定するとともに代謝標的部位の位置情報も併せて取得した。

●2020 年度に実施した統計分析

【PCB の化学特性と油症患者 PCB 蓄積パターンの関係について】

各 PCB 異性体の化学特性は、塩素置換数、*ortho*- 位、*meta*- 位、*para*- 位の炭素原子への水素原子結合数 (塩素原子未置換数)、隣り合う *ortho*- 位および *meta*- 位の炭素原子が両方ともに水素原子に結合している組み合わせの数 (*ortho*- 位および *meta*- 位に塩素原子が置換していない組み合わせの数)、隣り合う *meta*- 位および *para*- 位の炭素原子が両方ともに水素原子に結合している組み合わせの数 (*meta*- 位および *para*- 位に塩素原子が置換していない組み合わせの数)、MOE の分子特性計算機能を利用して算出したオクタノール水分配係数 ($\log P_{o/w}$)、分子量を使用した。これらの化学特性情報を用いて主成分分析をおこない、算出した主成分得

点をもとに PCB 異性体の散布図を作成した。

【PCB-CYP ドッキングシミュレーション結果と油症患者 PCB 蓄積パターンの関係について】

各 PCB-CYP の組み合わせにおいて、シミュレーションの結果として示されるドッキング様式の全てのパターンについて、ヘム鉄との距離が最短となる標的部位が 5Å 以内にある場合は [1]、5Å より大きい場合は [0] としてダミー変数を設定し、*ortho*- 位、*meta*- 位、*para*- 位ごとに整理した。また、油症患者と一般人の血液中 PCB 蓄積パターンを比較するため各 PCB 異性体濃度を CB153 濃度で割ることによって標準化し、油症患者と一般人の比を算出した Yusho/Control ratio (Log_2 Yusho patients (each congeners/CB153)/Controls (each congeners/CB153)) の値について、一般人と比較して油症患者において代謝されやすいと考えられる 0 未満の異性は [1]、蓄積しやすいと考えられる 0 以上の異性体は [0] としてダミー変数を設定した。

判別分析として変数増加法によるロジスティック回帰分析を用い、Yusho/Control ratio ダミー変数 [1 or 0] を従属変数、5Å を閾値として標的部位別の最短距離を分類したダミー変数 [1 or 0] を共変量とし、油症患者において代謝または蓄積されやすい PCB 異性体の判別に関連する因子を解析した。さらに、油症患者において代謝または蓄積されやすさの程度を考慮するため、ダミー変数に変換しない Yusho/Control ratio を従属変数、5Å を閾値として標的部位別の最短距離を分類したダミー変数 [1 or 0] を独立変数とし、ステップワイズ法による重回帰分析を用いて Yusho/Control ratio に影響する因子を解析した。

研究成果

PCB 異性体の化学特性について主成分分析を実施した結果、固有値が 1 以上となった第 1 主成分 (PC1) と第 2 主成分 (PC2) の累積寄与率は 84% となった。PC1 は分子サイズ・脂溶性の指標、PC2 は PCB 構造における塩素原子置換部位の指標と考えられた。主成分得点に基づく各 PCB 異性体の散布図を Fig. 1 に示す。なお、各 PCB 異性体濃度を

CB153 濃度で割ることによって標準化した Yusho/Control ratio の値をもとに、 <0 は一般人に比べて油症患者において易代謝性、 $0-0.5$ は蓄積性、 >0.5 は高蓄積性の PCB 異性体として分類し、色を変えて図示した。その結果、分子サイズ・脂溶性が大きいもの、また、同程度の分子サイズ・脂溶性の異性体でも外側に塩素原子が置換している数が多い異性体が油症患者で代謝されにくく蓄積しやすい傾向が示された。

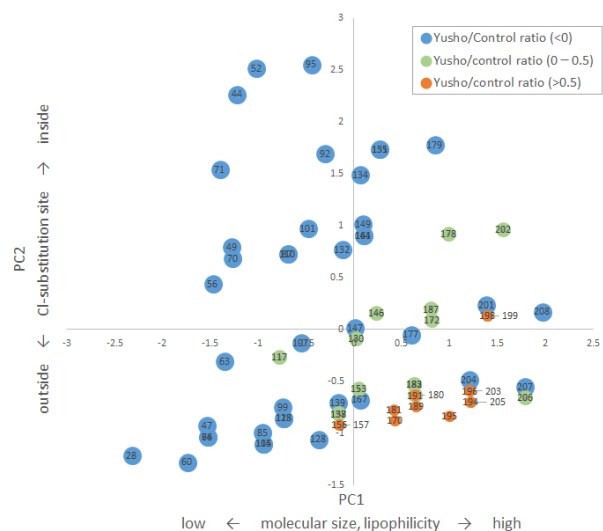


Fig. 1 Scatter plots of PC1 and PC2 obtained by principal component analysis for 69 PCB congeners. PCB congeners with <0 , $0-0.5$, >0.5 Yusho/Control ratios are shown in blue circles, green circles and red circles, respectively.

Yusho/Control ratio の値に基づき、各 PCB 異性体を油症患者において「代謝されやすい」または「蓄積されやすい」という 2 つのグループに分類し、その分類に関与する因子について判別分析を用いて解析した。その結果、CYP1A1 *meta*- 標的部位 (CYP1A1 のへム鉄から 5\AA 以内に PCB 異性体の *meta*- 位が標的部位として存在するかどうか) (オッズ比 4.1、 $p < 0.05$)、CYP2A6 *meta*- 標的部位 (オッズ比 3.9、 $p < 0.05$)、CYP1A1 *ortho*- 標的部位 (オッズ比 0.12、 $p < 0.05$) が 2 グループの分類に関与すると考えられた (総合正答率 78%)。なお、CYP1A1 *ortho*- 標的部位はオッズ比が 1 未満であるため、CYP1A1 が当該部位を標的とした場合は、その異性体が代謝されにくいという判別に影響すると考えられた。

また、Yusho/Control ratio の値は PCB 異性体ごとに異なることから、油症患者において代謝または蓄積されやすいそれぞれの分類群の中でその程度は異なっていると考えられる。そこで、PCB 異性体ごとに油症患者において代謝または蓄積されやすい程度を考慮するため、Yusho/Control ratio の値を従属変数として使用し、ステップワイズ法による重回帰分析を実施した。その結果、CYP1A1 *meta*- 標的部位 ($\beta = -0.22$)、CYP2A6

meta- 標的部位 ($\beta = -0.24$)、CYP2B6 *meta*- 標的部位 ($\beta = -0.34$)、CYP2B6 *para*- 標的部位 ($\beta = -0.30$) が選出され、Yusho/Control ratio の値に影響を与えていることが示唆された ($R^2 = 0.35$ 、 $p < 0.001$)。

本研究の解析結果から、CYP1A1、CYP2A6、CYP2B6 が油症患者に特徴的な PCB 蓄積パターンに関与しており、特に PCB 異性体の *meta*- 位を標的とした代謝能を有していることが重要な因子と考えられた。

成果発表

なし

今後の課題

これまでに実施した共同研究を通して、ヒト CYP 分子種と PCB の *in silico* 解析によるシミュレーション及び油症患者と一般人の血液中 PCB の化学分析データを統合して解析することにより、油症患者において代謝されやすい PCB 異性体の特徴と関与する CYP 分子種の特徴が明らかになってきた。

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。

- CYP 分子種と PCB 異性体を *in vitro* 系で反応させ、*in silico* 解析による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と確認をおこなう。
- Yusho/Control ratio の値と *in silico* 解析によるシミュレーションの結果から、油症患者において特徴的に生成される水酸化 PCB を予測し、その確認をおこなう。

上記の課題について、まず、油症患者で特徴的に低い蓄積パターンを示す PeCB118 について、シミュレーションの結果からその代謝能を有していることが推測された CYP2A6 を *in vitro* 系で反応させ、生成される水酸化 PCB を測定し、その代謝経路を明らかにする。

これらの研究を通して、油症患者の体内に残留する PCB やダイオキシン類の代謝・排泄を促進する治療法の開発に寄与していきたい。