

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32624

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18934

研究課題名(和文) マーモセット薬物代謝酵素チトクロムP450 2C分子種の機能および多型性解析

研究課題名(英文) The functional characterization of marmoset cytochrome P450 2C enzymes

研究代表者

上原 正太郎 (Uehara, Shotaro)

昭和薬科大学・薬学部・特任助教

研究者番号：10733123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マーモセットチトクロムP450(以下P450)2C分子種の薬物代謝機能を解析した。マーモセットP450 2C19はワルファリンおよびオメプラゾールを含めた多くのヒトP450 2C9/19基質を効率よく代謝した。マーモセット肝P450によるワルファリン酸化反応は、P450 2C19によりS体選択的であり、ヒト肝とよく似た特徴が認められた。P450 2C19遺伝子多型 p.[(Phe7Leu; Ser254Leu; Ile469Thr)]はマーモセットの肝薬物代謝能の個体差の一因であることが推察された。これらの知見はマーモセットを用いて創薬研究を行う際の基盤情報となる。

研究成果の概要(英文)：The enzymatic function of marmoset cytochrome P450 2C enzymes was analyzed. Recombinant marmoset P450 2C19 effectively metabolized human P450 2C substrates, S-warfarin, diclofenac, tolbutamide, flurbiprofen, and omeprazole. Marmoset P450 2C19 had high capacity and affinity for S-warfarin 7-hydroxylation that were comparable to those in human liver microsomes, indicating warfarin stereoselectivity similar to findings in humans. The interindividual variability of P450 2C-dependent drug metabolism such as S-warfarin clearance is at least partly accounted for by P450 2C19 variants p.[(Phe7Leu; Ser254Leu; Ile469Thr)] in marmosets. These findings on inter-individual variability and substrate specificity of marmoset P450 enzymes should help to understand apparent species differences in drug metabolism and disposition among marmosets and humans and to extrapolate the preclinical study data obtained using marmosets to humans.

研究分野：薬物代謝

キーワード：チトクロムP450 マーモセット

1. 研究開始当初の背景

小型霊長類であるマーモセットは現在、創薬研究に広く使われている霊長類であるカニクイザルに比べて少ない投与量でヒトの薬物毒性を評価できるメリットから注目されている。またマーモセットは霊長類で唯一ライン化可能な遺伝子改変動物を作製できるため、今後多くのヒト疾患モデルが開発され、創薬研究に広く使われる可能性が高いと考えられる。チトクロム P450 (P450) は処方薬の約 7 割について代謝への寄与が報告されていることから最も重要な薬物代謝酵素群であり、P450 の基質となる医薬品の約 20% が P450 2C サブファミリーによって代謝されると推定されている。ヒトにおいて最も多くの分子種で構成されている P450 2C サブファミリーは、P450 2C8、2C9、2C18、2C19 の 4 つの分子種で構成されており、その基質特異性については明らかになりつつある。また臨床上や薬物代謝における個人差および人種差の原因となっている重要な遺伝的多型も多数見出されている。しかしながらマーモセット P450 2C 分子種については P450 2C8 のみが同定されており、創薬研究におけるマーモセットの有用性については不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究は、以下の 2 つのアプローチによりマーモセット P450 2C 分子種の薬物代謝能およびその遺伝的多型が薬物代謝能に及ぼす影響について検討し、いまだ不明なマーモセットの薬物代謝特性を明らかにすることを目的とした。

(1) 新規マーモセット P450 2C 分子種の機能解析

ヒトにおける解析により P450 2C 分子種は多くの薬物の代謝に関与し、その遺伝的多型は薬物動態に多大な影響を及ぼすことが知られている。そのためマーモセットの薬物代謝特性を理解するためには P450 2C 分子種の解析が必須である。そこで cDNA クローニングに成功した新規マーモセット P450 2C18、2C19、2C58 および 2C76 の組換え P450 酵素を用いて薬物代謝能の評価を行い、ヒト P450 2C 分子種との機能の相同性および相違性について分子レベルで明らかにする。

(2) マーモセット P450 2C 遺伝子多型解析

マーモセット P450 2C 分子種の遺伝的多型を検出し、その変異による薬物代謝能の個体差への影響を明らかにすることで薬剤応答が一定のモデル動物作出の基盤情報を整備する。

3. 研究の方法

(1) マーモセット P450 2C 遺伝子発現の臓器特異性に関する検討

マーモセット肝臓、腎、小腸、肺および脳等から抽出した total RNA を用いて cDNA ライブラリを調製した。P450 2C 遺伝子の発現量は、各分子種を特異的に検出できるプライマーおよびプローブを用いたリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により解析した。

(2) マーモセット組換え P450 2C 酵素を用いた薬物代謝能の評価

各マーモセット P450 2C 分子種の発現プラスミドを作製し、大腸菌を用いた P450 還元酵素とのタンパク質共発現を行った。ヒト P450 2C 分子種の指標基質を用いた薬物酸化酵素活性を測定し、触媒機能の相同性および相違性についてヒト組換え P450 酵素と比較した。

(3) マーモセット P450 2C19 遺伝子多型の検出

マーモセット 30 個体の凍結肝臓および皮膚から調製したゲノム DNA を用いて、ダイレクトシーケンシングによりエキソン領域の変異を検出した。

(4) 組換え変異型 P450 酵素を用いたマーモセット P450 2C19 遺伝子多型の機能解析

非同義置換を生じる遺伝子多型については、P450 分子種の薬物代謝能を変化させる可能性がある。非同義変異が見出された P450 2C 分子種は、部位特異的変異導入法により変異を導入した発現プラスミドを作製し、組換え変異型 P450 酵素の調製を行った。発現させた変異タンパク質を用いて薬物代謝活性測定を行い、非同義変異が薬物代謝能に与える影響を検討した。

4. 研究成果

マーモセットゲノムの解析によって P450 2C クラスター上に 5 種の P450 2C 遺伝子 (P450 2C8、2C18、2C19、2C58 および 2C76 遺伝子) を見出した (図 1)。ゲノムの DNA 配列に基づいて設計したプライマーを用いてマーモセット肝臓から逆転写 PCR により 5 種の P450 2C cDNA のクローニングに成功した。ヒトにはオソログが存在しない P450 2C76 を除いて、マーモセット P450 2C 分子種は対応するヒト P450 2C 分子種に対して高いアミノ酸相同性 (>86%) を示した (表 1)。

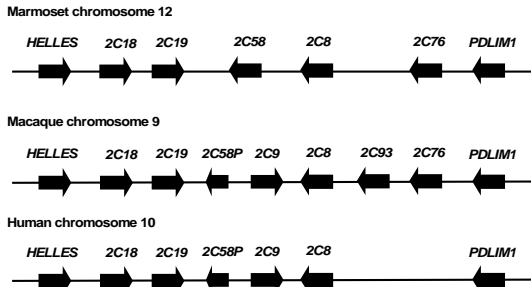


図 1. マーモセット、マカクおよびヒト P450 2C クラスターの比較.

表 1. マーモセットおよびヒトの P450 2C 分子種のアミノ酸相同性.

	P450	Marmoset P450				
		2C8	2C18	2C19	2C58	2C76
Human P450	2C8	86	78	76	87	68
	2C9	78	82	86	79	68
	2C18	77	93	77	78	70
	2C19	77	81	86	78	69

さらにマーモセット組織における P450 2C mRNA の発現分布を定量 PCR により解析した。5 種のマーモセット P450 2C mRNA の発現量はいずれも肝臓で最も高値を示した (図 2)。特に P450 2C8 および 2C19 はマーモセット肝臓で豊富に発現する主要な P450 2C 分子種であることが明らかになった。

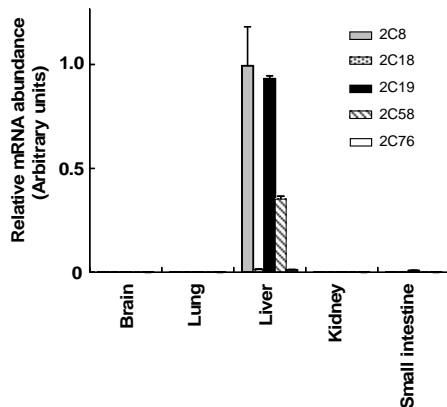


図 2. マーモセット P450 2C mRNA の組織発現分布

マーモセット P450 2C 酵素の基質選択性を調べるため、大腸菌発現系で調製した組換えマーモセット P450 2C 酵素を用いて典型的なヒト P450 2C 指標酵素活性を調べた。マーモセット P450 2C19 はヒト P450 2C9/2C19 基質ワルファリン、ジクロフェナク、フルルピプロフェンおよびオメプラゾールを効率良く代謝した (図 3)。ワルファリン酸化的代謝の立体選択性は、ヒトおよびカニクイザル肝でそれぞれ S 体および R 体選択的であるが、マーモセット肝は P450 2C19 を介してヒト肝と同様に S 体選択的であった (図 4)。ラセミ体ワルファリンをマーモセットに静脈内投与し、S-および R-ワルファリンの血中濃度を調べたところ、R 体に比べて S 体の速やかな消失が認められた (図 5)。

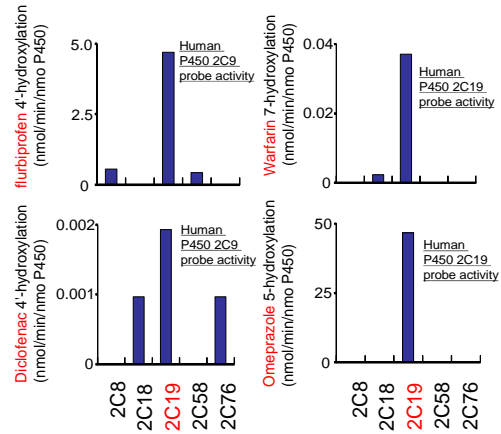


図 3. 組換えマーモセット P450 2C 酵素の薬物酸化酵素活性.

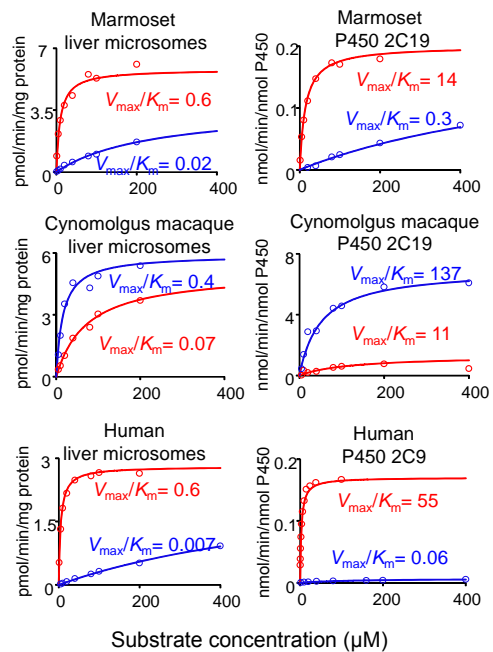


図 4. マーモセット、カニクイザルおよびヒト肝ミクロゾームおよび組換え P450 2C 酵素を用いた S (赤) -および R (青) -ワルファリン 7-水酸化酵素活性における速度論的解析結果.

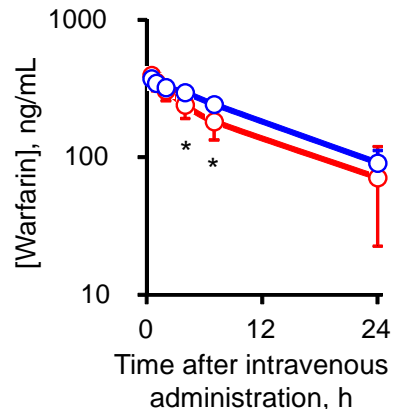


図 5. 0.2 mg/kg のラセミ体ワルファリンを静脈内投与したマーモセットの S (赤) -および R (青) -ワルファリンの血中濃度. プロットは 6 匹のマーモセットから得られた測定値

の平均を示す。

S-ワルファリンの血中消失が遅かったマーモセット個体の P450 2C19 遺伝子配列を調べたところ、3 つの非同義置換変異 (Phe7Leu, Ser254Leu, Ile469Thr) を見出した (図 6)。Ser254Leu を導入した変異体 P450 2C19 酵素は、野生型 P450 2C19 酵素と比較して著しく S-ワルファリン 7-水酸化酵素活性が低下した (図 7)。これらの結果から P450 2C19 遺伝子多型 p. [(Phe7Leu; Ser254Leu; Ile469Thr)] はマーモセットの P450 2C 依存的な薬物代謝の個体差の一因であることが示唆された。

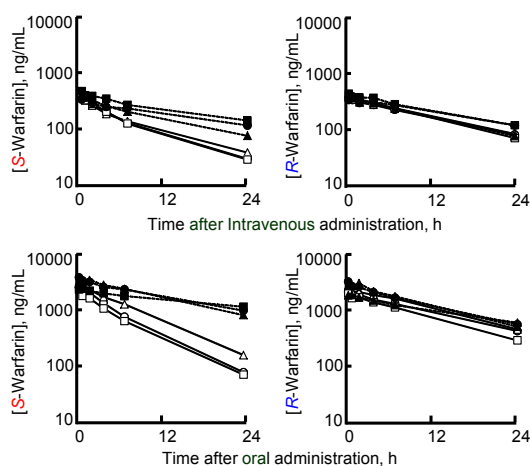


図 6. P450 2C19 遺伝子多型 p. [(Phe7Leu; Ser254Leu; Ile469Thr)] に伴う血中からの S-および R-ワルファリン消失の遅延。野生型 3 個体および変異型 3 個体の血中ワルファリン濃度をそれぞれ白および黒のプロットで示す。

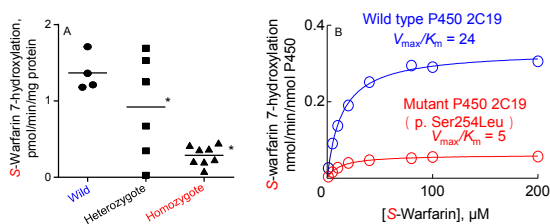


図 7. P450 2C19 遺伝子多型 p. [(Phe7Leu; Ser254Leu; Ile469Thr)] の S-ワルファリン 7-水酸化酵素活性への影響。A は P450 2C19 遺伝子型が既知の 18 個体のマーモセット肝ミクロゾームの S-ワルファリン 7-水酸化酵素活性、B は野生型および変異型組換えマーモセット P450 2C19 酵素の S-ワルファリン 7-水酸化酵素活性を示す。

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 22 件)

1. Uehara, S., Uno, Y., Ishii S., Inoue, T., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Regio- and stereo-selective oxidation

of a cardiovascular drug metoprolol mediated by cytochrome P450 2D and 3A enzymes in marmoset livers. Drug Metab Dispos., 査読有, in press.

2. Uehara, S., Uno, Y., Okamoto, E., Inoue, T., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Molecular cloning and characterization of marmoset aldehyde oxidase. Drug Metab Dispos., 査読有, in press.
3. Uehara, S., Uno, Y., Tomioka, E., Inoue, T., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Functional characterization and tissue expression of marmoset cytochrome P450 2E1. Biopharm. Drug Dispos., 査読有, in press. doi: 10.1002/bdd.2080.
4. Uehara, S., Yuki, Y., Uno, Y., Inoue, T., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Terfenadine *t*-butyl hydroxylation catalyzed by human and marmoset cytochrome P450 3A and 4F enzymes in livers and small intestines. Xenobiotica, 査読有, in press. doi: 10.1080/00498254.2017.1321811.
5. Uehara, S., Shimizu, M., Uno, Y., Inoue, T., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Marmoset Flavin-Containing Monooxygenase 3 in the Liver Is a Major Benzydamine and Sulindac Sulfide Oxygenase. Drug Metab Dispos., 査読有, 45, 497-500, 2017.
6. Uehara, S., Uno, Y., Nakanishi, K., Ishii, S., Inoue, T., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Marmoset Cytochrome P450 3A4 Ortholog Expressed in Liver and Small-Intestine Tissues Efficiently Metabolizes Midazolam, Alprazolam, Nifedipine, and Testosterone. Drug Metab Dispos., 査読有, 45, 457-467, 2017.
7. Uehara, S., Uno, Y., Inoue, T., Sasaki, E. and Yamazaki, H., Cloning and expression of a novel catechol-*O*-methyltransferase in common marmosets. J Vet Med Sci., 査読有, 79, 267-272, 2017.
8. Uehara, S., Uno, Y., Suzuki, T., Inoue, T., Utoh, M., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Strong induction of cytochrome P450 1A/3A, but not P450 2B, in cultured hepatocytes from common marmosets and cynomolgus monkeys by typical human P450 inducing agents. Drug Metab Lett., 査読有, in press.
9. Uno, Y., Uehara, S., and Yamazaki, H. Utility of non-human primates in drug development: comparison of non-human primate and human drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes. Biochem

- Pharmacol., 査読有, 121, 1-7, 2016.
10. Uehara, S., Kawano, M., Murayama, N., Uno, Y., Utoh, M., Inoue, T., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Oxidation of *R*- and *S*-omeprazole stereoselectively mediated by liver microsomal cytochrome P450 2C19 enzymes from cynomolgus monkeys and common marmosets. *Biochem Pharmacol.*, 査読有, 120, 56-62, 2016.
 11. Uehara, S., Uno, Y., Ishii, S., Inoue, T., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Marmoset cytochrome P450 4A11, a novel arachidonic acid and lauric acid ω -hydroxylase expressed in liver and kidney tissues. *Xenobiotica*, 査読有, 47, 553-561, 2016.
 12. Utoh, M., Suemizu, H., Mitsui, M., Kawao, M., Toda, A., Uehara, S., Uno, Y., Shimizu, M., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Human plasma concentrations of cytochrome P450 probe cocktails extrapolated from pharmacokinetics in mice transplanted with human hepatocytes and from pharmacokinetics in common marmosets using physiologically based pharmacokinetic modeling. *Xenobiotica*, 査読有, 46, 1049-1055, 2016.
 13. Uehara, S., Uno, Y., Inoue, T., Okamoto, E., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Marmoset cytochrome P450 2J2 mainly expressed in small intestines and livers effectively metabolizes human P450 2J2 probe substrates, astemizole and terfenadine. *Xenobiotica*, 査読有, 46, 977-985, 2016.
 14. Uehara, S., Uno, Y., Inoue, T., Kawano, M., Shimizu, M., Toda, A., Utoh, M., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Individual Differences in Metabolic Clearance of *S*-Warfarin Efficiently Mediated by Polymorphic Marmoset Cytochrome P450 2C19 in Livers. *Drug Metab Dispos.*, 査読有, 44, 911-915, 2016.
 15. Uehara, S., Uno, Y., Yuki, Y., Inoue, T., Sasaki, E., and Yamazaki, H., A new marmoset P450 4F12 enzyme expressed in small intestines and livers efficiently metabolizes an anti-histaminic drug ebastine. *Drug Metab Dispos.*, 査読有, 44, 833-841, 2016.
 16. Uehara, S., Uno, Y., Inoue, T., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Molecular cloning, tissue distribution, and functional characterization of marmoset cytochrome P450 1A1, 1A2, and 1B1. *Drug Metab Dispos.*, 査読有, 44, 8-15, 2016.
 17. Uehara, S., Uno, Y., Inoue, T., Suzuki, T., Utoh, M., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Caffeine 7-*N*-demethylation and *C*-8-oxidation mediated by liver microsomal cytochrome P450 enzymes in common marmosets. *Xenobiotica*, 査読有, 46, 573-578, 2016.
 18. Uehara, S., Inoue, T., Utoh, M., Toda, A., Shimizu, M., Uno, Y., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Simultaneous pharmacokinetics evaluation of human cytochrome P450 probes, caffeine, warfarin, omeprazole, metoprolol, and midazolam, in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Xenobiotica*, 査読有, 46, 163-168, 2016.
 19. Uehara, S., Uno, Y., Inoue, T., Kawano, M., Shimizu, M., Toda, A., Utoh, M., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Novel Marmoset Cytochrome P450 2C19 in Livers Efficiently Metabolizes Human P450 2C9 and 2C19 Substrates, *S*-Warfarin, Tolbutamide, Flurbiprofen, and Omeprazole. *Drug Metab Dispos.*, 査読有, 43, 1408-1416, 2015.
 20. Uehara, S., Uno, Y., Inoue, T., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Substrate selectivities and catalytic activities of marmoset liver cytochrome P450 2A6 differed from those of human P450 2A6. *Drug Metab Dispos.*, 査読有, 43, 969-976, 2015.
 21. Uehara, S., Uno, Y., Inoue, T., Murayama, N., Shimizu, M., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Activation and deactivation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro pyridine (MPTP) by cytochrome P450 enzymes and flavin-containing monooxygenases in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Drug Metab Dispos.*, 査読有, 43, 735-742, 2015.
 22. Uehara, S., Uno, Y., Hagihira, Y., Murayama, N., Shimizu, M., Inoue, T., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Marmoset cytochrome P450 2D8 in livers and small intestines metabolizes typical human P450 2D6 substrates, metoprolol, bufuralol, and dextromethorphan. *Xenobiotica*, 査読有, 45, 757-765, 2015.
- 〔学会発表〕(計 13件)
1. 上原正太郎、大塩徹、宇野泰広、井上貴史、佐々木えりか、山崎浩史：新規マーマセット P450 2F 酵素の同定および機能解析。日本薬学会第 137 年会。平成 29 年

- 3月24-27日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市).
2. 上原正太郎, 中西一志, 石井さくら, 宇野泰広, 井上貴史, 佐々木えりか, 山崎浩史, マーモセット P450 3A 酵素の臓器分布および薬物酸化酵素活性: ヒト P450 3A との類似性. 日本薬学会第 137 年会. 平成 29 年 3 月 24-27 日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市).
 3. 結城友香子, 上原正太郎, 宇野泰広, 井上貴史, 佐々木えりか, 山崎浩史, マーモセット, カニクイザルおよびヒト肝および小腸 P450 酵素によるテルフェナジンの酸化代謝. 日本薬学会第 137 年会. 平成 29 年 3 月 24-27 日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市).
 4. 石井さくら, 上原正太郎, 宇野泰広, 井上貴史, 佐々木えりか, 山崎浩史, マーモセット, カニクイザルおよびヒト肝によるメトプロロール酸化代謝の比較. 日本薬学会第 137 年会. 平成 29 年 3 月 24-27 日, 仙台国際センター (宮城県・仙台市).
 5. Uehara, S., Uno, Y., Inoue, T., Sasaki, E., and Yamazaki, H., Identification and characterization of cytochrome P450 4F enzymes in marmosets. 11th International ISSX Meeting. 平成 28 年 6 月 12-15 日, Busan (Korea).
 6. 清水万紀子, 三井満里奈, 河野未来, 上原正太郎, 宇野泰広, 鶴藤雅裕, 井上貴史, 佐々木えりか, 末水洋志, 山崎浩史, ヒト肝細胞移植マウスおよびマーモセット生理学的薬物動態モデルを活用したチトクロム P450 カクテル基質のヒト血中濃度推移予測. 日本薬学会第 136 年会. 平成 28 年 3 月 26-29 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).
 7. 上原正太郎, 岡本絵里子, 宇野泰広, 井上貴史, 佐々木えりか, 山崎浩史, 新規マーモセット P450 2J 酵素の同定および機能解析. 日本薬学会第 136 年会. 平成 28 年 3 月 26-29 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).
 8. 河野未来, 上原正太郎, 石井さくら, 宇野泰広, 井上貴史, 鶴藤雅裕, 佐々木えりか, 山崎浩史, マーモセット肝のワルファリン酸化代謝の立体選択性. 日本薬学会第 136 年会. 平成 28 年 3 月 26-29 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).
 9. 鈴木貴子, 上原正太郎, 村山典恵, 宇野泰広, 矢島加奈子, 鶴藤雅裕, 井上貴史, 佐々木えりか, 山崎浩史, マーモセットあるいはカニクイザル肝細胞を用いた薬物暴露によるチトクロム P450 誘導の評価. 日本薬学会第 136 年会. 平成 28 年 3 月 26-29 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).
 10. 上原正太郎, 結城友香子, 宇野泰広, 井

- 上貴史, 佐々木えりか, 山崎浩史, マーモセットおよびカニクイザル小腸 P450 酵素によるエバスチン酸化的代謝. 日本薬学会第 136 年会. 平成 28 年 3 月 26-29 日, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).
11. 河野未来, 上原正太郎, 宇野泰広, 鶴藤雅裕, 佐々木えりか, 山崎浩史, マーモセット肝のワルファリン代謝の解析. 第 59 回日本薬学会関東支部大会. 平成 27 年 9 月 12 日, 日本大学薬学部 (千葉県, 船橋市).
 12. 鈴木貴子, 上原正太郎, 宇野泰広, 鶴藤雅裕, 佐々木えりか, 山崎浩史, マーモセット肝のカフェイン代謝経路の解析. 第 59 回日本薬学会関東支部大会. 平成 27 年 9 月 12 日, 日本大学薬学部 (千葉県, 船橋市).
 13. Uehara, S., Uno, Y., Murayama, N., Shimizu, M., and Yamazaki, H., Molecular cloning, expression and functional characterization of marmoset cytochrome P450 2A6. 19th International Conference on Cytochrome P450. 平成 27 年 6 月 12-15 日, 国立オリンピック記念青少年総合センター (東京・渋谷区).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
上原 正太郎 (UEHARA, Shotaro)
昭和薬科大学・薬物動態学研究室・特任助教
研究者番号: 10733123
- (2) 研究分担者
なし。
- (3) 連携研究者
山崎 浩史 (YAMAZAKI, Hiroshi)
昭和薬科大学・薬物動態学研究室・教授
研究者番号: 30191274
- (4) 研究協力者
宇野 泰広 (UNO, Yasuhiro)
株式会社新日本科学