

令和元年5月20日現在

機関番号：72611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15520

研究課題名(和文)非ヒト霊長類および実験動物チトクロムP450の生化学的比較解析

研究課題名(英文)The functional characterization of cytochrome P450 enzymes from preclinical species

研究代表者

上原 正太郎(Uehara, Shotaro)

公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・研究員

研究者番号：10733123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：小型霊長類マーモセットは薬物動態研究に有用な非ヒト霊長類として注目されている。薬物代謝酵素チトクロムP450(P450)のP450 1A、2B、2C、2D、2Eおよび3Aサブファミリーに属するマーモセットP450分子種は、対応するヒトのP450分子種に対して高いアミノ酸相同性(大部分が85%以上)を示し、典型的なヒトP450基質を代謝した。さらにプロゲステロンの酸化的代謝におけるP450 3Aおよび2C分子種の役割は、ヒトとマーモセットの間で類似することが示唆された。本研究で得られた知見は、マーモセットがP450を介した薬物代謝および薬物動態研究のための良いモデルである可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医薬品開発において医薬候補化合物の有効性や安全性は実験動物を用いて評価される。薬物の安全性および毒性を予測するための薬物動態研究では、げっ歯類から非ヒト霊長類まで様々な実験動物が用いられる。本研究では、主要な薬物代謝酵素チトクロムP450の特性に着目し、小型霊長類マーモセットがヒト薬物動態を精度よく予測するために有用な動物種である可能性を示唆した。薬物動態研究にマーモセットを有効活用することで、より安全で有効性の高い医薬品の開発が加速することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Common marmosets (*Callithrix jacchus*) are attracting attention as non-human primate models in preclinical studies for drug development. Marmoset cytochrome P450 (P450) forms exhibited high degree of amino acid sequence identity (more than 85% in most of P450 orthologs) toward human P450 orthologs, and catalyzed typical human P450 substrates. In addition, the role of P450 3A and 2C enzymes for progesterone oxidation was similar to the case of human P450s. These results in this study suggested marmosets were potentially suitable animal models for drug metabolism and pharmacokinetics studies.

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 薬物代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医薬品開発過程では臨床試験に先立ち、動物実験により医薬品候補化合物の薬理活性、薬物動態および安全性が確認される。しかしながら、実験動物とヒトの体内動態には種差があり、実験動物で得られたデータがヒトで反映できないことがある。その原因の一つは薬物の主な消失過程である代謝の経路および速度の種差である。ラットおよびイヌは、それぞれ薬物の代謝速度または経路の面でヒトと大きな乖離があると考えられている。一方、カニクイザルは遺伝的および生理学的にヒトに近く、優れた医薬品開発モデルとして汎用される。近年、小型霊長類マーモセットが、少量の薬物でヒトにおける体内動態を予測できる実験動物として注目されている。主要な薬物代謝酵素であるチトクロム P450 (P450) のうち、主に薬物代謝に関与する P450 1 - 3 ファミリーに属する分子種の酵素学的性質の相違は薬物代謝における動物種差の一因である。しかしながら、実験動物とヒトの間の P450 分子種の生化学的特徴の相同性および相違性は十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

以下の3つのアプローチにより非ヒト霊長類および実験動物チトクロム P450 の生化学的性質を解析し、その薬物代謝特性を明らかにすることにより、医薬品開発段階で薬物代謝評価に適切な動物種を選択するための基盤情報を提供する。

1) ヒトおよび実験動物 P450 の薬物酸化触媒能の比較

P450 1 - 3 ファミリーの分子種は多くの薬物の代謝に関与し、その酵素学的性質の相違が薬物代謝における動物種差の一因であり、実験動物から得た薬物動態データのヒトへの外挿をより困難にしている。そこでげっ歯類から非ヒト霊長類までの様々な実験動物およびヒトの P450 酵素の薬物酸化触媒能を比較し、そ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) 薬物酸化反応に関わる P450 の触媒機能の動物種差に関する解析

薬物の代謝経路あるいは代謝速度は、P450 の酵素学的性質に基づいて動物種により異なる。*in vitro* 代謝実験により様々な薬物の代謝に関与する P450 分子種の役割をヒトと実験動物の間で比較解析し、医薬品開発で用いられる動物種の薬物代謝特性を明らかにする。

3) ヒト型薬物代謝特性を示す動物モデルの確立と評価

ヒト高齢者モデルの確立を目指して、P450 機能に基づくマーモセットの薬物代謝能の年齢差について解析し、ヒト型薬物代謝を示す医薬品開発モデルとしての有用性を評価する。

3. 研究の方法

ヒトおよび実験動物 P450 の薬物酸化触媒能および組織発現分布の比較解析

1) 新規実験動物 P450 酵素による薬物酸化の基質特異性および反応特異性の検討

ヒト、カニクイザルおよびマーモセット P450 は大腸菌を用いて P450 還元酵素とのタンパク質共発現を行った。ヒト P450 指標基質を用いてヒトおよび実験動物の組換え P450 酵素の薬物酸化活性を測定し、その薬物酸化触媒能の相同性および相違性を比較検討した。

2) 実験動物 P450 の遺伝子発現およびタンパク質発現の組織特異性に関する検討

予備的検討で得た15種類の新規マーモセット P450 を含む動物 P450 分子種について実施した。標的 P450 mRNA の定量は SYBR Green 法により分子種特異性および定量性を確認し実施した。標的 P450 タンパク質の検出は組換え P450 酵素を用いて分子種認識性を確認した市販の抗ヒトあるいはラット P450 抗体を用いた。

3) 肝薬物酸化酵素活性の動物種差の解析

実験動物の肝ミクロゾームによる様々な P450 基質の酸化酵素活性を調べ、どのような薬物種で実験動物とヒトにおける薬物代謝の種差が認められるか明らかにする。ヒトおよび実験動物のプール肝ミクロゾームは市販品を利用した。薬物酸化の反応特異性または基質特異性に動物種差が認められる薬物種について、個体肝ミクロゾームによる薬物酸化酵素活性の相関解析、組換え P450 酵素による薬物酸化酵素活性測定、P450 阻害剤あるいは P450 抗体を用いた酵素活性阻害実験を行い、薬物酸化に関与する P450 の役割をヒトと実験動物の場合で比較した。

4) マーモセットにおける5種 P450 基質の体内動態における年齢の影響

外部共同研究者の支援を得て典型的なヒト P450 基質のカクテルを経口および静脈内投与した。経時的に採取した血液中の薬物濃度を高速液体クロマトグラフ質量分析計にて分析し、血中からの薬物消失の特徴が報告されているヒトの場合と比較した。

4. 研究成果

医薬品開発におけるマーモセットの有用性を調べる目的で、代表的な薬物代謝酵素であるP450のアミノ酸配列の相同性および薬物酸化特性についてヒトの場合と比較検討した。これまでP450 1A、2C、2D、2Eおよび3Aサブファミリーに属する主要な薬物代謝型P450分子種はマーモセットとヒトのそれぞれ対応する分子種間の高いアミノ酸相同性（P450 2C76を除いて85%以上）を示し、薬物酸化触媒機能も類似していることが明らかにされている。未だ解析が不十分なマーモセットP450 2B酵素の生化学的特徴をヒトの場合と比較検討した。アミノ酸配列の比較解析により、マーモセットP450 2B6はヒトP450 2B6に対して86%の高いアミノ酸相同性を示し、げっ歯類等の他の実験動物のP450 2B酵素に比べてより進化的によりヒトに近いことが示された（図1）。マーモセット組織によるP450 2B6 mRNAの発現分布を調べたところ、調べた範囲でヒトP450 2B6と類似して、肝臓で最も高い発現量を示した（図2）。大腸菌発現系により調製した組換えマーモセットP450 2B6酵素はヒトP450 2B6の基質であるエトキシマリン、ペントキシシレゾルフィン、プロポフォルおよびテストステロンの酸化反応を触媒した。一方で、マーモセットP450 2B6にはヒトP450 2B6と異なり、エファビレンツ8-水酸化酵素活性が認められなかった。マーモセット肝ミクロゾームは効率的にプロポフォル4-水酸化反応を触媒し、その K_m 値は組換えP450 2B6酵素と類似して低値を示した（図3）。加えて、肝臓以外に分布するP450として新規マーモセットP450 2F1を同定した。ヒトP450 2F1と同様に、マーモセットP450 2F1はmRNAおよびタンパク質レベルで肺に強く発現が認められ、ビフェニルや7-エトキシマリンなどの基質を代謝することを明らかにした。以上の結果から、マーモセットP450の薬物酸化特性は、P450 2B6に認められるようにヒトP450分子種と一部で薬物酸化触媒能に違いは認められるものの、総じて類似していることが明らかになった。

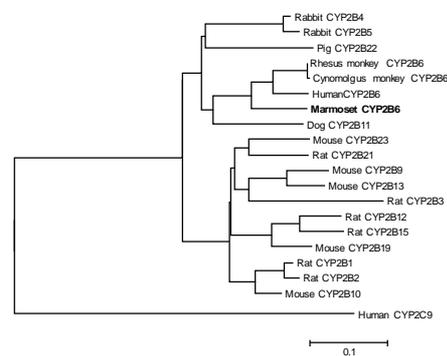


図1 P450 2B6 mRNA abundance in marmoset tissues.

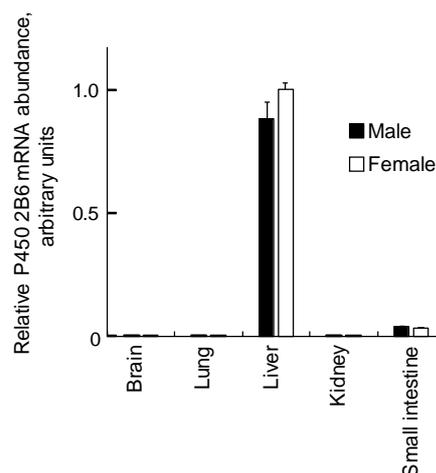


図2 P450 2B6 mRNA abundance in marmoset tissues.

薬物の代謝経路あるいは代謝

速度は、P450の酵素学的性質に基づいて動物種により異なる。*in vitro*代謝実験により様々な薬物の代謝に関与するP450分子種の役割をヒトと実験動物の間で比較解析した。ヒト肝における黄体ホルモンプロゲステロンの21/17 α および2 β /16 α /6 β 水酸化酵素反応は、P450 2C19およびP450 3A4により触媒される（Yamazaki et al., Arch Biochem Biophys., 1997）。マーモセット肝によるプロゲステロン21/17 α および16 α /6 β 水酸化酵素反応は、それぞれP450 2CおよびP450 3A酵素によって主に触媒されるフルルピプロフェン4-水酸化酵素活性およびミダゾラム1'-水酸化酵素活性と相関した。マーモセット肝によるプロゲステロン21/17 α および16 α /6 β 水酸化酵素反応は、抗ヒトP450 2Cおよび3A抗体によって抑制された。プロゲステロン酸化的代謝に関わるP450酵素を組換えマーモセットP450酵素を用いて調べたところ、21/17 α および16 α /6 β 水酸化反応におけるそれぞれP450 2C58/19およびP450 3A4/90の関与が明らかになった（図4）。ステロイド代謝を触媒するP450 2Cおよび3A酵素の役割は、ヒト肝およびマーモセット肝で類似していることが示唆された。

またヒト、カニクイザル、マーモセット、イヌ、ミニブタ、ラットおよびマウスの肝ミクロゾームによる抗不整脈薬プロパフェノンの主要酸化酵素活性を調べたところ、マーモセット肝のみがヒト肝と同様に5-水酸化反応を優先的に触媒した（図5）。興味深いことにラット肝の主要なプロパ

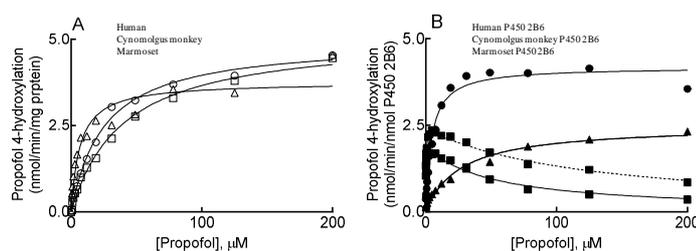


図3 Kinetic analyses for propofol 4-hydroxylation by pooled liver microsomes (A) and recombinant P450 2B6 enzymes (B).

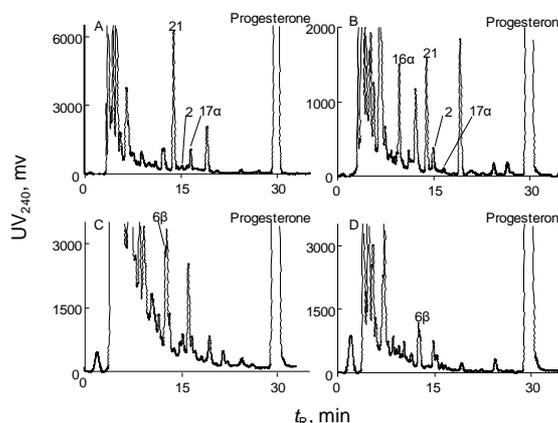


図4 Representative chromatograms of progesterone hydroxylation by recombinant marmoset P450 2C19 (A), 2C58 (B), 3A4 (C) and 3A90 (D) expressed in Escherichia coli.

フェノン酸化反応は、ヒト肝により触媒される 5-水酸化反応ではなく、4'-水酸化反応であった。ラット肝によるプロパフェノン 4'-水酸化反応は、P450 2D 阻害剤キニンおよび抗ヒト P450 2D6 抗体によって強く阻害された。組換え P450 酵素を用いたプロパフェノン代謝実験により、ラット P450 2D2 およびヒト P450 2D6 はそれぞれ優先的に 4'-および 5-水酸化反応を触媒することから (図 6) P450 2D 酵素の触媒機能がそれぞれの動物肝におけるプロパフェノン酸化代謝の特徴を決定づけていると考えられた。ヒトおよび実験動物肝の P450 2D 酵素を介したプロパフェノン酸化酵素反応の動物種差を分子レベルで明らかにした。

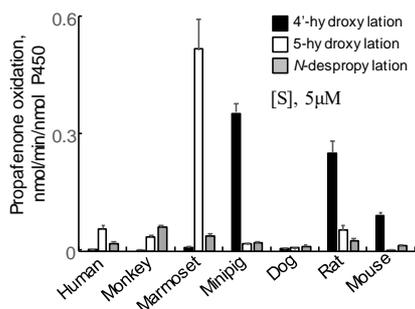


図5 Propafenone oxidation activities of liver microsomes from humans, cynomolgus monkeys, marmosets, minipigs, dogs, rats and mice.

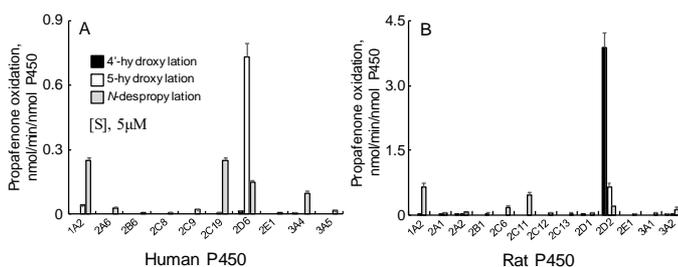


図6 Propafenone oxidation activities of recombinant human and rat P450s.

ヒトにおいて老化に伴う P450 3A4 および 2C9 酵素を介した薬物クリアランスの低下が報告されている。老齢および若齢マーモセットに典型的なヒト P450 基質のカクテルを経口および静脈内投与した。in silico 解析により得られた老齢マーモセット群におけるワルファリンおよびミダゾラムの肝クリアランスは、若齢マーモセットの場合と比較してそれぞれ 23% および 56% の低値を示した。マーモセットのヒト型老化動物モデルとしての有用性が示唆された (図 7)。

以上、本研究で得られた知見は医薬品開発の非臨床段階において、適切な実験動物を選択して薬物動態研究を実施し、得られたデータをヒト薬物動態予測に有効に活用するための重要な基盤情報となる。

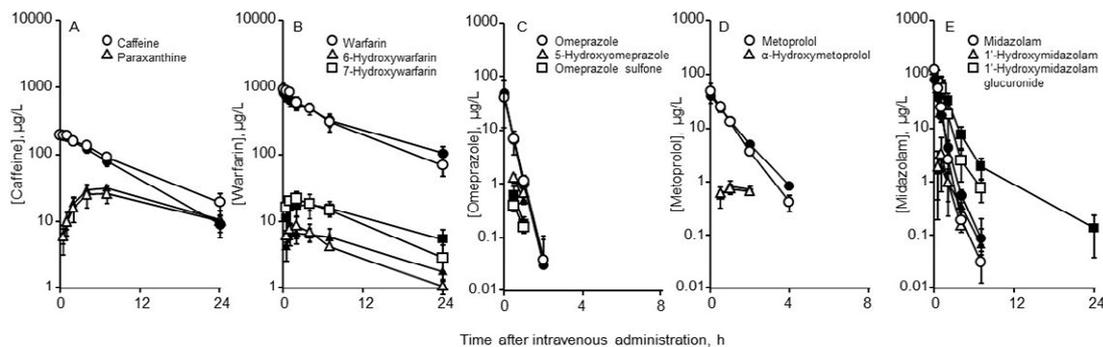


図7 Plasma concentrations are shown for five human P450 probes, i.e. caffeine (A), warfarin (B), omeprazole (C), metoprolol (D), and midazolam (E), in aged (closed symbols, n=4) and young (open symbols, n=3) marmosets after single combined intravenous administrations (0.2 mg/kg per probe).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

1. Uehara S, Oshio T, Nakanishi K, Tomioka E, Suzuki M, Inoue T, Uno Y, Sasaki E, Yamazaki H. Survey of Drug Oxidation Activities in Liver and Intestine Microsomes of Individual Common Marmosets, a New Nonhuman Primate Animal Model. *Curr Drug Metab.*, in press.
2. Uehara S, Murayama N, Yamazaki H, and Suemizu H. Regioselective hydroxylation of an antiarrhythmic drug, propafenone, mediated by rat liver cytochrome P450 2D2 differs from that catalyzed by human P450 2D6. *Xenobiotica*, in press.
3. Uno Y, Uehara S, Murayama N, and Yamazaki H. Cytochrome P450 1A1, 2C9, 2C19, and 3A4 Polymorphisms Account for Interindividual Variability of Toxicological Drug Metabolism in Cynomolgus Macaques. *Chem Res Toxicol.*, in press.
4. Uehara S, Higuchi Y, Yoneda N, Yamazaki H, and Suemizu H. Expression and inducibility of cytochrome P450s in human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized

- livers. *Xenobiotica*, in press.
5. Uno Y, Uehara S, and Yamazaki H. Polymorphisms of cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) in cynomolgus and rhesus macaques. *J Med Primatol.*, in press.
 6. Oshio T, Uehara S, Uno Y, Inoue T, Sasaki E, and Yamazaki H. Marmoset Cytochrome P450 2B6, a Propofol Hydroxylase Expressed in Liver. *Xenobiotica*, 49:265-269, 2019.
 7. Uno Y, Uehara S, Yamazaki H, Genetic polymorphisms of drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes in cynomolgus and rhesus monkeys and common marmosets in preclinical studies for humans. *Biochem Pharmacol.*, 153:184-195, 2018.
 8. Nakanishi K, Uehara S, Kusama T, Inoue T, Shimura K, Kamiya Y, Murayama N, Shimizu M, Uno Y, Sasaki E, and Yamazaki H. In vivo and in vitro diclofenac 5-hydroxylation mediated primarily by cytochrome P450 3A enzymes in common marmoset livers genotyped for P450 2C19 variants. *Biochem Pharmacol.*, 152:272-278, 2018.
 9. Uno Y, Uehara S, Mahadhi HMD, Ohura K, Hosokawa M, and Imai T. Molecular characterization and polymorphisms of butyrylcholinesterase in cynomolgus macaques. *J Med Primatol.*, 47:185-191, 2018.
 10. Kusama T, Toda A, Shimizu M, Uehara S, Inoue T, Uno Y, Utoh M, Sasaki E, and Yamazaki H. Association with polymorphic marmoset cytochrome P450 2C19 of in vivo hepatic clearances of chirally separated R-omeprazole and S-warfarin using individual marmoset physiologically based pharmacokinetic models. *Xenobiotica*, 48:1072-1077, 2018.
 11. Nakanishi K, Uehara S, Uno Y, Inoue T, Sasaki E, and Yamazaki H. Progesterone hydroxylation by cytochromes P450 2C and 3A enzymes in marmoset liver microsomes. *Xenobiotica*, 48:757-763, 2018.
 12. Uehara S, Uno Y, Oshio T, Inoue T, Sasaki E, and Yamazaki H. Marmoset pulmonary cytochrome P450 2F1 oxidizes biphenyl and 7-ethoxycoumarin and hepatic human P450 substrates. *Xenobiotica*, 48:656-662, 2018.
 13. Toda A, Uehara S, Inoue T, Utoh M, Kusama T, Shimizu M, Uno Y, Mogi M, Sasaki E, and Yamazaki H. Effects of aging and rifampicin pretreatment on the pharmacokinetics of human cytochrome P450 probes caffeine, warfarin, omeprazole, metoprolol and midazolam in common marmosets genotyped for cytochrome P450 2C19. *Xenobiotica*, 48:720-726, 2018.
 14. Uehara S, Uno Y, Inoue T, Sasaki E, and Yamazaki H. Molecular cloning and tissue distribution of a novel marmoset ABC transporter. *Biopharm Drug Dispos.*, 39:59-63, 2018.
 15. Utoh M, Miura T, Kusama T, Uehara S, Shimizu M, Uno Y, Yamazaki H. Efavirenz clearances in vitro and in vivo in six cynomolgus monkeys associated with polymorphic cytochrome P450 2C9 and simulated by individual physiologically based pharmacokinetic models. *Biopharm Drug Dispos.*, 38:439-442, 2017.
 16. Uehara S, Uno Y, and Yamazaki H. Hepatic expression of cytochrome P450 enzymes in non-human primate species. *J Med Primatol.*, 46:347-351, 2017.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 河村秀, 村山典恵, 小野関駿佑, 上原正太郎, 石井祐, 宇野泰広, 生城真, 山崎浩史, マー

- モセット肝 UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 触媒機能のサルとヒトとの比較, 日本薬学会第 139 年回, 平成 31 年 3 月 20-23 日, 幕張メッセ及び、ホテルニューオータニ幕張 (千葉県・千葉市)
2. 田中佐季, 村山典恵, 加藤雅巳, 上原正太郎, 宇野泰広, 山崎浩史, 医薬品等の抱合反応を触媒するマーモセット肝グルタチオン S-転移酵素分子種, 日本薬学会第 139 年回, 平成 31 年 3 月 20-23 日, 幕張メッセ及び、ホテルニューオータニ幕張 (千葉県・千葉市)
 3. 水野紗和, 三浦智徳, 吉沢愛映, 上原正太郎, 神矢佑輔, 村山典恵, 清水万紀子, 末水洋志, 山崎浩史, グルクロン酸抱合活性の種差を考慮したフタル酸ジブチル経口投与後の生理学的薬物動態モデルによるヒト体内動態予測, 日本薬学会第 139 年回, 平成 31 年 3 月 20-23 日, 幕張メッセ及び、ホテルニューオータニ幕張 (千葉県・千葉市)
 4. 三浦智徳, 吉沢愛映, 水野紗和, 上原正太郎, 神矢佑輔, 村山典恵, 清水万紀子, 末水洋志, 山崎浩史, 生理学的薬物動態モデルとヒト肝移植マウスを用いた短鎖鎖フタル酸ジエステル類のヒト尿中予測排泄速度の差異, 日本薬学会第 139 年会, 平成 31 年 3 月 20-23 日, 幕張メッセ及び、ホテルニューオータニ幕張 (千葉県・千葉市)
 5. Uehara S, Higuchi Y, Yoneda N, Yamazaki H, and Suemizu H, Expression and inducibility of cytochrome P450 in human hepatocytes from humanized-liver TK-NOG mice, 2018MDO/JSSX, 平成 30 年 10 月 1-5 日, 石川県立音楽堂 (石川県・金沢市)
 6. Murayama N, Uehara S, Ishii Y, Onozeki S, Kawamura S, Ikushiro S, Uno Y, Yamazaki H, Activities of UDP-glucuronosyltransferase 1A/2B enzymes in marmoset liver microsomes: comparison with cynomolgus macaques and humans, 2018MDO/JSSX, 平成 30 年 10 月 1-5 日, 石川県立音楽堂 (石川県・金沢市)
 7. Uehara S, Higuchi Y, Yoneda N, Yamazaki H, and Suemizu H, EXPRESSION AND INDUCTION ABILITY OF CYTOCHROME P450 IN HUMAN HEPATOCYTES HARVESTED FROM CHIMERIC MICE WITH HUMANIZED LIVER., 22nd North American ISSX Meeting, 平成 30 年 7 月 15-19 日, Montreal Convention Center, (Montreal, Quebec, Canada).
 8. 中西一志, 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 P450 2C および 3A 酵素によるプロゲステロン水酸化酵素活性, 日本薬学会第 138 年回, 平成 30 年 3 月 25-28 日, 石川県立音楽堂 (石川県・金沢市)
 9. 草間崇史, 清水万紀子, 戸田亜希子, 上原正太郎, 井上貴史, 宇野泰広, 鶴藤雅裕, 佐々木えりか, 山崎浩史, チトクロム P450 2C19 多型性を示すマーモセット個体別 R-オメプラゾールと S-ワルファリン血中濃度推移の生理学的薬物動態モデルによる予測, 日本薬学会第 138 年回, 平成 30 年 3 月 25-28 日, 石川県立音楽堂 (石川県・金沢市)

2.1111

〔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) 研究分担者

なし。

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：末水 洋志

ローマ字氏名：SUEMIZU Hiroshi

研究協力者氏名：山崎 浩史

ローマ字氏名：YAMAZAKI Hiroshi

研究協力者氏名：宇野 泰広

ローマ字氏名：UNO Yasuhiro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。