

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659074

研究課題名（和文） カイコを用いた薬物動態評価モデルの確立

研究課題名（英文） Evaluation of pharmacokinetic using silkworm as an animal model

研究代表者

浜本 洋 (HAMAMOTO HIROSHI)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：90361609

研究成果の概要（和文）：

本研究において、カイコの腸管にシトクローム P450 が存在し、ヒトのシトクローム P450 によって代謝されることが知られている化合物の大部分が、カイコ腸管において代謝されることを明らかにした。また、トランスジェニック技術を用いた、ヒトシトクローム P450 遺伝子発現カイコを樹立し、野生型系統が代謝できなかった化合物の代謝ができることを見いだした。従って、カイコの創薬のモデル動物として有用性が示されたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In this research, it is shown that cytochrome P450 is expressed in silkworm midgut and most of compounds, metabolized by cytochrome P450 in mammals, were also metabolized in silkworm midgut. The transgenic silkworm expressing human cytochrome P450 could metabolize the compound that was not metabolized in wild-type silkworm. These results further entrenched usefulness of silkworm as a model animal for drug discovery.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：医療系薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：カイコ、薬物動態、シトクローム P450、抗生物質

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、カイコを利用した細菌感染症モデルにおいて、抗生物質の定量的な治療効果の評価系を確立した。そのバイオアッセイ系を利用して、土壌細菌の培養抽出物から治療効果を指標に探索を行い、新規リポペプチド系抗生物質を見いだしている。本抗生物質は、マウス黄色ブドウ球菌感染モデルにおいても既存の抗生物質に比べても少ない用量で治療効果を示し、かつ急性毒性も示さないなど臨床応用可能な特長を有する。このように、カイコモデルは、ほ乳類にも治療効果を示す抗生物質を発見できることから、その薬物体内動態は類似していると考えられ

るが、その詳細な解析は行われていなかった。体内動態は、薬物の吸収・分布・代謝・排泄の要素から成り立っている。そのうち、吸収については申請者らによる研究により、ほ乳類と同じように化合物の分子量と油水分分配係数が腸管の透過性に大きな影響を与えること、及び経口投与で治療無効な抗生物質はカイコでも経口投与で治療無効であることを明らかにしている。また、体液タンパク質との結合が抗菌薬の分布に影響し、治療効果の有無を左右することも明らかにしている。さらに、モデル化合物をカイコ体液中に投与後、化合物は第1相反応であるシトクローム P450 による代謝の後、第2相反応である抱

合反応を受けるなど、その代謝経路がほ乳類と同じであることを見いだしている。しかしながら、どのような臓器によって代謝を受けるか、またどのようなシトクローム P450 の反応があるかは明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

研究代表者等は、カイコの病態モデルにおける治療効果を指標とした医薬品候補薬の探索法を提唱している。これまでの医薬品候補化合物の探索研究により、実際にマウスモデルでも治療効果を示す抗生物質の取得が可能であることを見いだしている。しかしながら、カイコにおいて代謝をはじめとする薬物動態については研究されておらず、その基盤的理論については明らかになっていなかった。本研究では、カイコを創薬のモデル動物としての地位を確固たるものにすべく、カイコにおけるシトクローム P450 の反応、及び薬物動態の解明を行い、ほ乳類との比較を行う。また、ヒトとの差異を克服すべく、ヒト型シトクローム P450 発現カイコの作出による、創薬モデルの確立を試みる。

3. 研究の方法

(1) カイコシトクローム P450 反応の解析

①代謝臓器の解析：5 齢 4 日目以降のカイコを緩衝液中で解剖し、各組織を摘出した。摘出組織は、10%牛血清を含有する TC-100 昆虫細胞培養用培地を 2ml 中で培養し、7-エトキシマリンを加え、27°C で培養した。経時的に培地及び臓器を回収し、ホモジナイズ後、50%アセトン抽出し蒸発乾固した。この試料を 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH=6.0 に再溶解し、抱合反応により負荷されたグルコースを β -glucosidase 処理により除去後、緩衝液 (1.6M glycine /NaOH pH10.5) と混合し、7-エトキシマリンからシトクローム P450 反応によって生じたヒドロキシマリン量を蛍光測定 (Ex= 380nm/ Em= 460nm) によって定量した。

②シトクローム P450 反応の解析：カイコ腸管を用いて上記と同じ手法によって器官培養した。基質を培地に加え培養後、腸管及び培地をホモジナイズし 50%アセトン抽出し、蒸発乾固した。蒸発乾固した試料を 50%メタノールに再溶解し、HPLC 分析試料とした。Luciferin 誘導体については、培地サンプルを Detection reagent と混合してルミノメーターにより定量した。

③カイコミクロソーム画分の調製：5 齢 4 日目以降のカイコを緩衝液中で解剖し、ホモジ

ナイズ用緩衝液 (100mM リン酸緩衝液 pH 7.5、1mM EDTA、2mM ベンサミジン、10% グリセロール) へ移した。テフロンホモジナイザーでホモジナイズし、9000×g、4°C、10 分遠心した。上清のろ液を 49,000rpm 4°C 30min 遠心した。沈殿をホモジナイズ用緩衝液でサスペンドし、チューブへ分注し液体窒素により凍結した。保存は -80°C にて行った。

④ *in vitro* シトクローム P450 反応系：100mM リン酸ナトリウム (pH7.5) 緩衝液中に基質及びミクロソーム画分を加え、30°C で 5 分インキュベーションした。NADPH 再生系 (final 3.3mM glucose-6-phosphate, 1.25mM NADP, 3.3mM MgCl₂, 0.25U glucose-6-phosphate dehydrogenase) を加えて 30°C で反応を開始した。

⑤シトクローム P450 の RT-PCR による発現解析：5 齢のカイコを緩衝液中で解剖し、腸管・脂肪体・マルピーギ管を摘出し、mRNA を抽出した。得られた mRNA から逆転写酵素によって cDNA を調製し、それを鋳型にしてシトクローム P450 用プライマーとカイコアクチン BmA3 用プライマーで PCR によって増幅した。

(2) ヒト型シトクローム P450 発現カイコの樹立

農業生物資源研究所の瀬筒らのグループとの共同研究により、カイコ w1-PND 系統を用いて、ヒト型シトクローム P450 1A2 遺伝子発現系統を樹立した。

(3) ヒト型シトクローム P450 発現カイコの解析

ヒト型シトクローム P450 1A2 の発現は、それぞれの系統のカイコの脂肪体を摘出し、タンパク質を調製した後、抗ヒトシトクローム P450 1A2 抗体によりウェスタンブロッティング法により解析した。カフェインの血中濃度は、5 齢の 2g のシトクローム P450 1A2 トランスジェニックカイコに 1mM のカフェイン溶液を 50 μ l 注射し、経時的に血液を採取し、50%アセトン抽出した物を HPLC にて解析した。また、カフェインの毒性試験は、5 齢 1 日のトランスジェニックカイコを体重測定後、50mM のカフェイン溶液を 50 μ l 注射し餌を与えて飼育し、経時的に体重測定を行った。

4. 研究成果

(1) カイコ腸管におけるシトクローム P450 による反応

7-エトキシマリンはヒトにおいてシトクローム P450 によって脱エチル化され、7-ヒドロキシマリニンに代謝されることが知られている。7-ヒドロキシマリニンが蛍光を示すことから、カイコから抽出した臓器の器官培養系に 7-エトキシマリンを加え、7-ヒドロキシマリニンに変換された量を蛍光光度計により測定した。その結果、7-エトキシマリンは、主に腸管において代謝されることを見いだした。

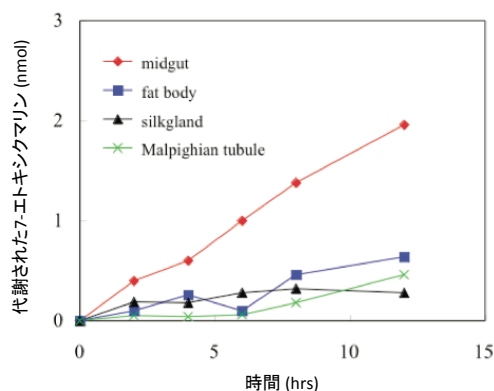


図1 7-エトキシマリニンの代謝部位

この腸管における 7-エトキシマリニンの代謝は、シトクローム P450 の阻害剤である、シメチジンによって阻害されることから、シトクローム P450 による反応であると考えられる。

次に、ヒトにおいてシトクローム P450 によって代謝される 14 種の化合物について、代謝を受けるか否かを検討したところ、カフェインを除いてすべて代謝されることが分かった。そこで、カイコ腸管におけるシトクローム P450 の有無を検討するため、マイクロソーム画分を調製し、一酸化炭素結合差スペクトルを解析した。その結果、図 2 に示すような、シトクローム P450 に特徴的なスペクトルが見いだされたことから、カイコ腸管においてシトクローム P450 が存在していることが確認された。

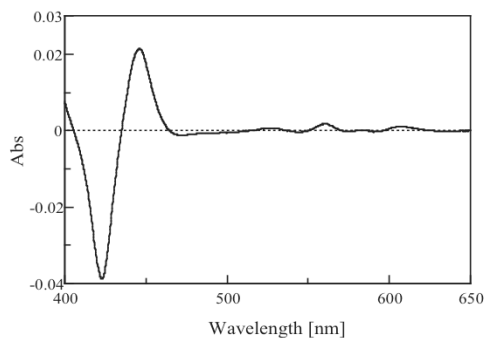


図2 カイコ腸管マイクロソーム画分に対する一酸化炭素結合差スペクトル

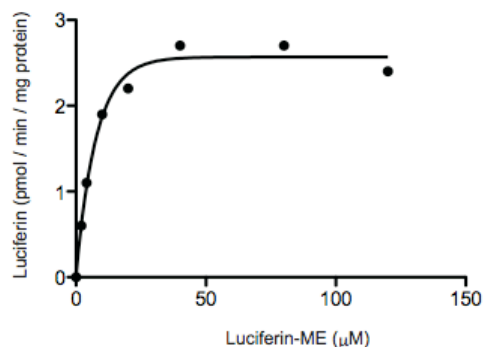


図3 カイコ腸管マイクロソーム画分におけるシトクローム P450 による反応

そこで、腸管におけるシトクローム P450 の代謝反応が起こるか否かを検証する目的で、腸管の器官培養系において代謝された化合物のうち、Luciferin-ME を用いて、カイコ腸管から調製したマイクロソーム画分における *in vitro* における代謝を検討した結果、マイクロソームのタンパク質量依存的な反応が認められ、 V_{max} は $3.0 \text{ pmol / min / mg protein}$ であり、 K_m 値は $7.8 \mu\text{M}$ であった (図 3)。以上の結果から、カイコの腸管のマイクロソーム画分において、薬物の代謝が行われていることを示している。

次に、腸管におけるシトクローム P450 の発現を検討した。カイコのゲノム中には 81 個のシトクローム P450 に相同する遺伝子が、ゲノムプロジェクトの解析から見いだされている。それぞれのシトクローム P450 遺伝子の発現について、腸管における発現を RT-PCR により検討した結果、28 種類の遺伝子の発現が確認できた。それらについて、脂肪体及びマルピーギ管での発現を検討した結果、脂肪体及びマルピーギ管の両方で発現していた遺伝子が 16 種類、脂肪体で発現が確認された遺伝子が 4 種類、マルピーギ管で発現が確認された遺伝子が 3 種類、両方で発現が認められなかった遺伝子は 5 種類であった。

以上の結果は、カイコ腸管において、シトクローム P450 が発現し、外来薬物の代謝を担っていることを示唆している。従来、カイコにおいて、哺乳動物の肝臓に相当すると言われていた臓器は脂肪体であると言われていた。本研究により、カイコにおける薬物代謝は、一部の薬物については、腸管で担われていることを示唆している。カイコは開放血管系であるため、腸管から吸収された化合物は、直接哺乳動物の血液に相当する、ヘモリンフ (血リンパ) に放出され、各臓器に曝されることになる。そのため、外界との直接の接点になっている腸管において、薬物代謝が担われていることは、生物学的な合目性があ

ると考えられる。また、腸管における代謝は、哺乳動物の初回通過効果に相当すると考えられ、腸管吸収性を有する化合物のスクリーニングにおいて考慮すべき事項となる。

(2) ヒト型シトクローム P450 発現カイコの樹立

ヒトのシトクローム P450 1A2 で代謝されるカフェインは、カイコにおいて代謝されなかった。そこで、ヒトの代謝モデルを作成できるか否か検討する目的で、ヒト型シトクローム P450 1A2 遺伝子を導入し、トランスジェニックカイコの樹立を試みた。農業生物資源研究所の瀬筒先生との共同研究により、トランスジェニックカイコ樹立用ベクターの UAS プロモーターの下流にヒトシトクローム P450 1A2 遺伝子を導入した。得られたプラスミドを、カイコの受精卵に導入し、ゲノム上に挿入されたトランスジェニックカイコ系統を樹立した。本トランスジェニックカイコは、GAL4 を発現する系統と交配することにより、UAS 下流の遺伝子発現が誘導される様に設計されている。ウェスタンブロッティング法により導入したタンパク質の発現を検討した結果、図 4 に示すように、GAL4 遺伝子依存に、ヒトシトクローム P450 タンパク質の発現が確認できた。

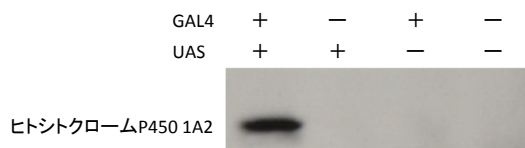


図4 トランスジェニックカイコにおけるシトクローム P450 の発現

次に、本トランスジェニックカイコにおけるカフェインの代謝能を検討した。その結果、ヒトシトクローム P450 1A2 遺伝子を発現したトランスジェニックカイコでは、発現していないカイコに比べ、カフェインの半減期が短くなっていることが判明した(図 5)。従って、ヒトシトクローム P450 をカイコに発現させ、機能させることが可能であることが示された。さらに、野生型カイコにカフェインを過剰に投与すると、成長が抑制することを見いだしているが、ヒトシトクローム P450 1A2 を発現したトランスジェニックカイコでは、その毒性が抑制されていることを見いだした。これらの結果から、トランスジェニックカイコ技術を用いることにより、ヒトのシトクローム P450 によって代謝される薬物の動態を、カイコを用いて評価できる可能性が示された。

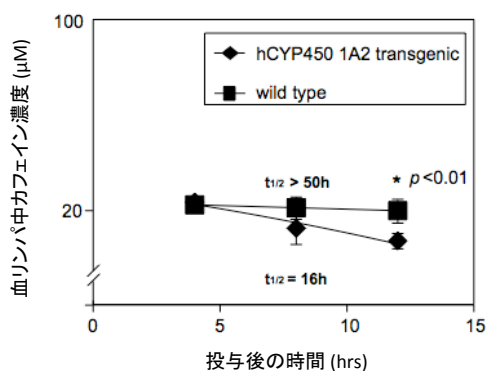


図5 トランスジェニックカイコにおけるカフェインの血中濃度推移

(3) カイコにおける代謝産物の解析

カイコ腸管においてリファンピシジンが代謝されることを明らかにした。その代謝産物について、哺乳動物において予想される代謝産物が認められるか否かを HPLC により検討した。その結果、予想される溶出時間に、代謝産物のピークは認められなかった。他の複数の化合物についても、同様の結果が認められた。従って、カイコにおけるシトクローム P450 の反応によって生じる化合物の代謝産物は、哺乳動物のものとは異なることが考えられる。この結果から、カイコを用いることにより、他の動物種では得ることが難しい、水酸化化合物を得ることができることが期待される。従って、カイコは新しい化合物を得るためのバイオリクターとしての利用が可能であると考えられる。今後、これらの代謝産物の構造について明らかにする必要がある。

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 4 件)

(1) Nobukazu Sekimizu, Atmika Paudel, Hiroshi Hamamoto, Animal welfare and use of silkworm as a model animal., *Drug Discov Ther*, 査読有り, 6, 2012, 226-229 DOI : 10.5582/ddt.2012.v6.4.226

(2) Tomoko Fujiyuki, Hiroshi Hamamoto, Kenichi Ishii, Makoto Urai, Keiko Kataoka, Tadahiro Takeda, Shoji Shibata, Kazuhisa Sekimizu, Evaluation of innate immune stimulating activity of polysaccharides using a silkworm (*Bombyx mori*) muscle contraction assay., *Drug Discov Ther*, 査読有り, 6, 2012, 88-93 DOI : 10.5582/ddt.2012.v6.2.88

(3) Akira Kushida, Ryo Horie, Kenji Hattori, Hiroshi Hamamoto, Kazuhisa Sekimizu, Hiroomi Tamura, Xanthurenic acid is an endogenous substrate for the silkworm cytosolic sulfotransferase, bmST1., *Journal of Insect Physiology*, 査読有り, 58, 2012, 83-88
DOI : 10.1016/j.jinsphys.2011.10.003

(4) Hiroshi Hamamoto, Makoto Urai, Atmika Paudel, Ryo Horie, Kazuhisa Murakami, Kazuhisa Sekimizu, Identification of Novel Therapeutically Effective Antibiotics Using Silkworm Infection Model, *YAKUGAKU ZASSHI*, 査読無し, 132, 2012, 79-84
DOI : 10.1248/yakushi.132.79

〔学会発表〕(計8件)

- ① 浜本洋、石川繭子、瀬筒秀樹、坪田拓也、片岡啓子、松本靖彦、垣内力、関水和久、カイコ病態モデルを利用した医薬品の探索研究、日本薬学会 第133年会(招待講演)、2013年3月27日~30日、横浜
- ② 植木拓朗、杉田拓也、浜本洋、松本靖彦、関水和久、奥村秀信、Silkworm(カイコ)を用いた急性経口毒性試験代替法の投与方法の検討、第25回日本動物実験代替法学会、2012年12月7日~9日、東京
- ③ 杉田拓也、植木拓朗、浜本洋、松本靖彦、関水和久、奥村秀信、Silkworm(カイコ)を用いた急性経口毒性試験代替法の開発、第25回日本動物実験代替法学会、2012年12月7日~9日、東京
- ④ 石川繭子、浜本洋、坪田拓也、瀬筒秀樹、大西忠博、中尾和貴、饗場篤、片岡啓子、関水和久、がん治療薬評価モデルカイコの開発、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月10日~14日、福岡
- ⑤ 浜本洋、Su Jie、Atmika Paudel、浦井誠、片岡啓子、関水和久、新規抗生物質カイコシンの作用機序解析に関する研究、第34回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2012年11月15日~16日、京都
- ⑥ 浜本洋、Su Jie、浦井誠、Atmika Paudel、片岡啓子、関水和久、新規環状リポペプチド系抗生物質カイコシンの作用機序解析、第24回微生物シンポジウム、2012年9月3日~4日、大阪
- ⑦ 浜本洋、カイコ病態モデルを利用した新規医薬品の開発、ポストゲノム昆虫研究会(招待講演)、9月12日、福岡
- ⑧ 堀江亮、浜本洋、二橋美瑞子、瀬筒秀樹、関水和久、ヒトシトクローム P450 トランスジェニックカイコの作出、第84回日本生化学会大会、2011年9月21日~24日、京都

〔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

http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~bisei/research_hamamoto.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜本 洋 (HAMAMOTO HIROSHI)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：90361609