

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580462

研究課題名(和文)ネコにおけるハイスループット薬物代謝酵素測定システムの開発

研究課題名(英文)Highthroughput system for determination of drug metabolism in cats

研究代表者

寺岡 宏樹 (TERAOKA, Hiroki)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：50222146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ネコの薬物代謝に関する知見は著しく不足している。本研究では薬物代謝に重要な数種のネコのシトクロームP450(CYP)の大腸菌膜発現系を用いた薬物相互作用のスクリーニング系を確立した。6種のCYPに好適な蛍光基質を選定し、ヒトの分子種特異的阻害薬や小動物臨床で使用されている薬の影響を検討した。その結果、一部の抗真菌薬や麻酔薬が低濃度で阻害作用を示した。ネコ肝臓に最も多く発現するCYP2Eを低濃度で抑制する薬は見つからなかった。ネコCYP3Aを阻害する多くの薬が確認されたが、ヒトやイヌのCYP3Aに比べて感受性が低かった。さらに多くの臨床薬の阻害作用について本システムを用いて検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Cytochrome P450s (CYPs) are most important metabolizing enzymes for pharmaceutical drugs in mammals. Although domestic cat is the most common companion animal, the properties of the CYPs are largely unknown. In this study, we developed heterologously expressed feline CYPs in Escherichia coli to generate high-throughput CYPs activity assay systems. CYP2E2 transcripts were most abundant followed by 2A13 in the liver, while CYP3A131 is the major CYP in the small intestine. Suitable fluorescent substrate for high-throughput screening was selected for each CYP subtype. Some antifungal agents and sedatives showed strong inhibition in CYP subtype-specific manner. We could not find any drug that inhibits CYP2E2 in lower concentration. Many drugs inhibited CYP3A131 in relatively higher concentrations than human CYP3A4 and canine CYP3A12. The results suggest the usefulness of this system.

研究分野：獣医薬理学、毒性学

キーワード：薬物代謝酵素 シトクロームP450 コンパニオンアニマル ネコ 薬物相互作用 中毒

### 1. 研究開始当初の背景

コンパニオンアニマルで認可されている薬は驚くほど少ない。それゆえ動物病院では多くの人体用医薬品薬が使用されている。これは薬事法に基づいた獣医師に許された裁量であるが、人体用医薬品で事故が起きた場合は適用外のため、メーカーではなく、獣医師にその責任が求められる。肝臓のシトクローム P450 モノオキシゲナーゼ (P450) はヒトの約 7 割の薬物代謝に関与する最も重要な酵素である。P450 は種差や遺伝的多型による個体差があることでよく知られており、薬害の大きな原因となる。また、P450 を阻害する医薬品も少なくなく、薬物間相互作用による投薬事故を起こす。しかし、イヌを除く獣医療が対象とする動物の P450 に関する情報は少なく、これは主要なコンパニオンアニマルであるネコにさえてはまる。それゆえ、新しい薬をネコへ投与する際には、ヒトやビーグル犬のデータを参考にしているのが現状である。

一部の分子種 (CYP1A2、2E) の酵母発現系を除いて、肝臓ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝実験に分子種特異的な基質と阻害薬を使用することで検討されてきた。しかしこれらはヒトやラットで確認されたものであり、ビーグル犬を含めて特異性には種差があることから、ミクロソーム分画を用いて P450 分子種の性質を検討することは原理上困難である。現在、ネコは一般的な実験動物としては認知されておらず、ビーグル犬のような標準系統も定められていない。一般市民の感情を考慮すると、コンパニオンアニマルとして市販されているネコを実験に使うことは許されない。患畜から肝臓などを容易に採取することができない以上、多型 P450 の代謝活性は人工的発現系を用いることでのみ検討しうる。P450 の大腸菌発現系は簡便に遺伝子変異を誘起できる系が確立しており、収量が多い。

### 2. 研究の目的

本研究では、ネコの P450 分子種の大腸菌発現系を作出し、蛍光基質の代謝活性を蛍光マイクロプレートリーダー等で検出するハイスループットな代謝活性測定システムを構築する。医薬品の P450 阻害作用を検討するとともに、比較のために、ビーグル犬の P450 分子種の発現系も立ち上げる。ネコ P450 分子種の遺伝的多型とその分布を明らかにした上で、本システムを用いて、P450 の多型分子種の代謝活性も検討する。本研究はネコにおける新しい人体薬品などの至適投薬量を推定し、種差や個体差、さらに薬物相互作用を予見することで、薬害のない効果的な薬物治療の確立に貢献することを目指している。

### 3. 研究の方法

1) 肝臓を中心とした主要臓器における各

P450 分子種の発現量比をリアルタイム PCR 法 (SYBR Green 法) により算定した。

2) 避妊手術による摘出臓器を試料とし、各 P450 分子種についてシークエンスすることで、遺伝的多型を探索した。さらに、多型の簡易検出法のため、特に特異性の高いプライマーを用いたリアルタイム PCR 法を検討した。

3) 多型遺伝子を含めて、ネコにおける主要 P450 分子種の大腸菌発現系を作出した。

4) 簡便かつ迅速な代謝活性測定法のため、P450 分子種の基質となるいくつかの蛍光基質を用いた。この代謝活性系を用いて、医薬品の P450 活性阻害作用を検討した。

### 4. 研究成果

1) 薬物代謝に関与する主要な P450 分子種の cDNA およびアミノ酸配列:

ネコの薬物代謝に重要と思われる CYP2 分子種のうち、新たに CYP2B6 の全長配列を明らかにできた。CYP2B6 は肝臓からは検出されず、肺と小腸で比較的多く発現していた。ヒト CYP2B6 を認識する抗体でウエスタンブロットを行ったところ、肺では検出できたが、肝臓では陽性バンドが得られなかったことから、ネコ肝臓には CYP2B 分子種が発現していない可能性がある。この他、CYP2C については 2 種の偽遺伝子のみ得られた。これらの遺伝子はイヌと最も高い相同性を示し、ヒトがこれに続いた。

2) 主要 P450 分子種の組織発現:

肝臓では CYP2E1/2>2A13/25>3A131/132>1A2>2D6 の順に発現していた。一方、小腸で発現している CYP 分子種は CYP3A131 が圧倒的であり、ついで CYP2B であった。調べた組織において、どの CYP 分子種についても発現量に性差は認められなかった。

3) ネコ P450 分子種の大腸菌発現系の構築とその代謝活性:

脂溶性の高い 5'末端を削ってウシの CYP17 と取り替える Iwata ら (1999) の方法に加えて、大腸菌膜タンパクである ompA に P450 cDNA 全長を連結させることにより (Pritchard et al., 2006) CYP1A2、2A13、2B6、2E2、3A131 の分子種の膜タンパクを作成できた。リコンビナント CYP 分子種の活性を 7-ethoxy-、7-benzyloxy、7-methoxy-resorufin (ER、BR、MR)、coumarin、7-benzyloxy-、7-ethoxy、7-methoxy-4-trifluoromethylcoumarin (BFC、EFC、MFC)、7-ethoxycoumarin (7EC) を用いて測定した。CYP1A2 は 3 種のレゾルフィン誘導体と BFC を、2A13 は ER、coumarin、7EC を、2B6 は ER、MR、EFC を、2E2 は MR と 7EC を、3A131 は BFC を顕著に代謝した。固有クリアランスは、(EROD) 1A2>>2A6=2B6、(MR) 2B6>>1A2>2E2、(BFC) 1A2>3A131、(7EC) 2A6>>2B6=2E2 の順に高かった。BR は 1A2

だけが、coumarin は 2A13 だけが、EFC は 2B6 だけが代謝し、MFC はいずれにも代謝されなかった。

4)ネコ P450 分子種代謝活性に対する阻害薬の作用：

肝臓で発現していない CYP2B6 を除いて、CYP1A2、2A13、2E2、3A131 の基質として BFC、coumarin、EFC、7EC を使用した。その結果、clotrimazole、ketoconazole、miconazole などのアゾール系抗真菌薬とメドトミジンが CYP3A131 に対して 1 $\mu$ M 前後の IC<sub>50</sub> 値を示した。メドトミジンは CYP2A13 や 1A2 に対しても低濃度で抑制した。CYP3A131 はこの他の薬に対しても比較的低濃度で抑制される傾向があった。CYP2E2 を低濃度で抑制する薬は見つからなかった。

5)ネコ、イヌ、ヒト CYP3A 分子種の比較：薬物代謝で主要かつ薬物相互作用を最も受けやすい CYP3A 分子種について、ネコの投薬の参考となるヒト (3A4、3A5) およびイヌ (3A12) の大腸菌発現系を作成し、BFC 代謝に対する各阻害薬の影響を観察した。その結果、ヒト CYP3A5 を除いて、ネコ、イヌ、ヒトの 3A の阻害薬に対する反応性は概ね類似していた。ネコは低い感受性を示す傾向があった。

6) ネコ P450 分子種の遺伝的多型と代謝に及ぼす影響：

CYP1A2: 16 匹のネコ精巢および卵巣から調整した cDNA コード領域を調べた結果、3 箇所の同義置換、7 箇所の非同義置換を同定した。

CYP2D6: ネコ 6 匹の肝臓由来 cDNA コード領域を調べた結果、同義置換および非同義置換ともそれぞれ 4 カ所が認められた。さらに、The amplification refractory mutation system (ARMS)プライマーを用いて SYBR Green によるリアルタイム PCR を行う簡易検出法を確立して 50 匹のネコゲノムを調べた結果、基質認識部位に認められた非同義変異を持つ個体は 2 例であった。

CYP3A131: ネコ 15 匹の肝臓と、14 匹の精巢あるいは卵巣由来 cDNA を用いて、コード領域全長を調べた結果、2 ヶ所の同義置換と 10 ヶ所の非同義置換を同定した。このうち 1 ヶ所は停止配列を含んでいた。酵素活性に影響をおよぼす可能性の高い基質認識部位における 2 種の非同義置換の一方、および両者を持つ CYP3A131 を大腸菌に発現させた結果、3 種の変異型は BFC 活性の Km 値が対照よりも一桁以上高くなり、V<sub>max</sub> は半減した。

いずれの分子種とも野生型の出現頻度が低く、5-6 割程度(ハプロタイプ)であった。しかし、これらはいくまで生殖腺から調整した cDNA を用いた成績であり、ゲノムや肝臓など他器官については今後の検討が必要である。

総括として、本研究により、1)ネコ肝臓および小腸における 10 種の CYPs の発現量を明らかにした。その結果、肝臓に最も多く発現しているのは CYP2E1/2 であり、これに CYP2A13 が続く。小腸では CYP3A131 が圧倒的に発現しており、一部、CYP2B6 が発現していた。肝臓に発現している機能的な CYP2B、2C 分子種を同定することはできなかった。3)ネコ CYP1A2、2A6、2B6、2E2、3A131 の大腸菌発現系を確立し、それぞれの分子種が代謝する蛍光基質を選定できた。5) CYP3A131 は多くの薬に阻害されやすかった。CYP3A131 は小腸で主要な分子種であることから、特に経口投与による薬物相互作用に關与する可能性がある。6) 獣医療で重要なメドトミジン、アチパメゾール、及びアゾール系抗真菌薬は低濃度から抑制作用を示した。臨床用量でも薬物相互作用を起こす可能性がある。ネコの肝臓で主要な CYP2E2 はほとんど阻害されなかった。7) CYP3A で示されたように、また文献と比較して、どの分子種もネコはヒトよりも阻害されにくかった。ネコは薬物相互作用を比較的受けにくいことが示唆された。8) 少なくとも生殖腺由来の cDNA を調べた限り、ネコの多型頻度は非常に高かった。本成績で確立されたシステムを用いて、さらに多くの臨床薬の代謝や阻害作用を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) Kim KH, Park HJ, Kim JH, Kim S, Williams DR, Kim MK, Jung YD, Teraoka H, Park HC, Choy HE, Shin BA, Choi SY. Cyp1a reporter zebrafish reveals target tissues for dioxin. *Aquat Toxicol.* 2013. 134-135: 57-65.

2) Teraoka H, Okuno Y, Nijoukubo D, Yamakoshi A, Peterson R, Stegeman JJ, Kitazawa T, Hiraga T. and Kubota A. *Aquat Toxicol.* 2014. Involvement of COX2-thromboxane pathway in TCDD-induced precardiac edema in developing zebrafish. 154:19-26.

3) 寺岡宏樹. 2014. 動物の毒性物質感受性に関する現在の知見;種差,系統差,個体差. *中毒研究* 27, 314-319.

4) Okamatsu G, Komatsu T, Kubota A, Onaga T, Uchida T, Endo D, Kirisawa R, Yin G, Inoue H, Kitazawa T, Uno Y, Teraoka H. Identification and functional characterization of novel feline cytochrome P450 2A. *Xenobiotica in press*

[学会発表](計 4 件)

1)寺岡宏樹、川上 圭、浅倉弘幸、岡松 岳、井上博紀、宇野泰広、北澤多喜雄. 大腸菌発

現系を用いたネコ シトクローム P450 3A  
ハイスループット薬物相互作用のスクリー  
ニング系の構築 . 第 155 回日本獣医学会学術  
年会 . 平成 25 年 3 月 30 日 . 東京大学駒場キ  
ャンパス (東京都)

2) 岡松 岳、川上 圭、小松徹也、宇野泰広、  
北澤多喜雄、寺岡宏樹 . ネコ、イヌ、ヒトに  
おけるシトクローム P450 3A 分子種の動物  
種差 . 平成 26 年 1 月 11 日 . 北里大学薬学部  
(東京都)

3) Hiroki Teraoka, Gaku Okamatsu, Tetsuya  
Komatsu and Takio Kitazawa . Comparative  
Characterization of Feline Cytochrome P450  
3A by Fluorescent Inhibition Assay . 54th  
Society of Toxicology, Annual Meeting . 2014 年 3  
月 24 日 . Phoenix Convention Center ( Phoenix,  
AZ, USA )

4) 岡松 岳、小松 徹也、宇野 泰広、打出毅、  
北澤 多喜雄、寺岡宏樹 . ネコ シト  
クローム P450 発現系の構築と阻害薬による  
スクリーニング . 第 37 回日本分子生物学会  
年会 . 平成 26 年 11 月 27 日 . パシフィコ横  
浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等  
特になし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

寺岡 宏樹 (TERAOKA HIROKI)  
酪農学園大学・獣医学群・教授  
研究者番号 : 50222146

### (2)研究分担者

打出毅 (UCHIDE TSUYOSHI)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号 : 20327456

### (3)研究分担者

井上博樹 (INOUE HIROKI)

酪農学園大学・農食環境学群・准教授

研究者番号 : 90305904

平成 25 年 3 月 22 日 退職により削除

### (4)連携研究者 なし