

学 位 論 文 題 名

Identification and characterization of CYP2C76 in cynomolgus monkeys

(カニクイザルにおける CYP2C76 の同定と解析)

学位論文内容の要旨

サルは進化的にヒトに近い動物種の一つであり、その薬物代謝パターンが一般に極めてヒトに近い。新薬開発における薬物代謝や安全性の試験において重要なモデル動物として使用されている。しかし、稀にはあるがヒトと異なる代謝パターンを示すことが明らかとなってきた。これは、チトクローム P450 (CYP) を始めとする薬物代謝酵素におけるサルとヒトとの違いが一因であると考えられるが、ヒトやラットに比べてサルでは薬物代謝酵素遺伝子が十分に同定・解析されておらず、種差の原因を詳細に理解することが困難であった。そこで本研究では、サルの薬物代謝を分子レベルでより深く理解するための第一歩として、カニクイザル肝臓で EST (expressed sequence tags) を網羅的に取得して、薬物代謝酵素の cDNA を同定し解析することにより、以下の結果が得られた。

1. カニクイザル肝臓から 1,064 種類の異なる EST を取得し、多くの薬物代謝酵素をコードする cDNA を同定することに成功した。CYP については計 21 種類の異なる分子種をコードする cDNA を同定することができた。さらに、得られた EST を解析することによりヒトには存在しないサル EST の同定を試みたところ、薬物代謝酵素では、新規の CYP2C である CYP2C76 の EST を候補として同定することができた。
2. 得られた CYP cDNA の塩基配列を解析したところ、得られたクローンのほとんどがヒト CYP をコードする遺伝子の塩基配列と cDNA レベルで 93% 以上の相同性を示したのに対し、CYP2C76 のみがいずれのヒト CYP とも比較的低い (約 80%) 相同性しか示さなかったため、CYP2C76 がヒトには存在しない分子種である可能性が考えられた。よって、本研究では CYP2C76 について更なる解析を行うことにした。
3. 同定することができた 4 種類のカニクイザル CYP2C 分子種について遺伝子発現を調べたところ、これらの CYP2C の中では CYP2C76 が最も高く肝臓で発現しており、CYP2C76 がカニクイザルの肝臓では最もメジャーな CYP2C であることが示唆され

た。また、CYP2C76 がタンパク質として肝臓で発現し、ヒト CYP2C のモデル基質を用いた代謝実験により CYP2C76 が代謝機能を有する分子種であることが分かった。

4. CYP2C76 がヒトには存在しない分子種であるかどうか調べるために RT-PCR およびウェスタン・ブロッティングを行ったところ、mRNA およびタンパク質レベルで CYP2C76 様の CYP2C をヒトでは検出することができなかった。また、サル CYP2C のゲノム構造を調べたところ、ヒトと同様に CYP2C はゲノム上でクラスターを形成しており、CYP2C76 がこのクラスターの末端に存在し、この領域がヒトのゲノム上では遺伝子の存在しない領域 (intergenic region) に相当することから、ヒトには CYP2C76 に相当する遺伝子が存在しないことが示された。
5. 以上のことから、CYP2C76 が薬物代謝におけるサルとヒトの種差の一因である可能性が考えられたので、ピタバスタチンをモデル薬物として CYP2C76 の代謝への関与を調べた。その結果、ヒトには見られないサルの代謝物の生成やヒトでは CYP3A4 による代謝反応にサルでは CYP2C76 が関与していることから、CYP2C76 がピタバスタチンの代謝におけるサルとヒトの種差の一因となっていることが明らかになった。
6. これまでの結果から、CYP2C76 の機能をもたないサルは、よりヒトに近い代謝パターンを示す可能性が考えられた。カニクイザル CYP2C76 において網羅的に遺伝子多型を探索することにより計 46 種類の多型を見出したが、その中に 1 塩基の欠損を伴う多型があった。この変異がゲノム上に存在すると、フレームシフトにより未熟な終始コドンが生じるため、翻訳されても機能的な CYP タンパク質が生じないことが明らかになった。これまでに、この多型をヘテロで有する個体を雄雌数頭ずつ見出すことに成功したが、今後、ホモ個体を見出す、或いはヘテロ個体から生み出すことができれば、薬物代謝におけるより良いモデル動物になるものと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 田 正 一

副 査 名誉教授 鎌 滝 哲 也

副 査 教 授 伊 藤 茂 男

副 査 准教授 石 塚 真由美

学 位 論 文 題 名

Identification and characterization of CYP2C76 in cynomolgus monkeys

(カニクイザルにおける CYP2C76 の同定と解析)

サルはその薬物代謝パターンが一般に極めてヒトに近いと、新薬開発における薬物代謝や安全性の試験において重要なモデル動物として使用されている。しかし、稀にはあるが、同じ医薬品について、ヒトとサルでは異なる代謝パターンを示すことが明らかとなってきた。これは、医薬品開発におけるヒトへの安全性確保にきわめて重要な問題である。チトクローム P450 (CYP) を始めとする薬物代謝酵素におけるサルとヒトとの違いが一因であると考えられるが、サルでは薬物代謝酵素遺伝子が十分に同定・解析されておらず、種差の原因の詳細は明らかではなかった。そこで宇野氏は、カニクイザル肝臓で EST (expressed sequence tags) を網羅的に取得して、薬物代謝酵素の cDNA を解析し、計 21 種類の異なる CYP 分子種をコードする cDNA を同定した。このほとんどがヒト CYP の塩基配列と cDNA レベルで 93% 以上の相同性を示したのに対し、今回新規に見つけた CYP2C76 はいずれのヒト CYP とも比較的低い (約 80%) 相同性しか示さなかった。遺伝子発現を調べたところ、CYP2C76 はカニクイザルの肝臓では最もメジャーな CYP2C であることが示唆された。また、CYP2C76 が代謝機能を有する酵素タンパク質として肝臓で発現していることも明らかにした。RT-PCR およびウェスタン・ブロッティングを行ったところ、mRNA およびタンパク質レベルで CYP2C76 様の CYP2C をヒトでは検出することができなかった。また、サル CYP2C 遺伝子のゲノム構造を調べたところ、ヒトと同様に CYP2C 遺伝子はゲノム上でクラスターを形成しており、CYP2C76 遺伝子がこのクラスターの末端に存在していることが分かった。この領域はヒトのゲノム上では遺伝子の存在しない領域 (intergenic region) に相当する。明らかに、CYP2C76 に相当する遺伝子はヒトでは存在しないことが示された。

以上のことから、CYP2C76 が薬物代謝におけるサルとヒトの種差の要因である可能性が考えられたので、ピタバスタチンをモデル薬物として CYP2C76 の代謝への関与を調べた。その結果、ヒトには見られないサル独自の代謝物の生成や、ヒトでは CYP3A4 が行う代謝反応をサルでは CYP2C76 が行っていることが明らかになった。これらから、CYP2C76 がピタバスタチンの代謝におけるサルとヒトの種差の要因となっていることが明らかになった。以上、宇野氏はこれまで原因が明らかにされていなかったヒトとサルの薬物代謝の種差の要因が、ヒトには存在しない、サル独特の CYP 分子種、CYP2C76 の存在によるものであることを明らかにした。

医薬品開発における薬物代謝や安全性研究に汎用されるサルにおいて、ヒトと対応しない薬物代謝酵素が存在するという知見は既存の認識を変える重要な発見であり、より安全な医

薬品開発に資するものである。また、この遺伝子の同定は、ヒトにより近い薬物代謝酵素組成を持ったモデル動物作出にも道を開くものである。

よって審査員一同は、上記学位論文提出者宇野康弘氏が、博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。