



Title	Investigation of mechanisms of rodenticide-resistance using a closed colony of rodenticide-resistant black rats (<i>Rattus rattus</i>) from Tokyo
Author(s)	武田, 一貴
Citation	北海道大学. 博士(獣医学) 甲第14111号
Issue Date	2020-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k14111
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/80766
Type	theses (doctoral)
File Information	Kazuki_TAKEDA.pdf



[Instructions for use](#)

東京由来殺鼠剤抵抗性クマネズミ (*Rattus rattus*) クローズドコロニーを
用いた殺鼠剤抵抗性獲得機序の解明

*Investigation of mechanisms of rodenticide-resistance using a closed colony
of rodenticide-resistant black rats (Rattus rattus) from Tokyo*

2019年3月

北海道大学 大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座 毒性学教室

武田 一貴

目次

略語一覧		2
図表一覧		5
第一章	序論	7
第二章	Leu76Pro 変異 VKOR の <i>in vitro</i> 酵素速度論的解析・ <i>in silico</i> 結合性シミュレーションによる解析	15
第三章	ワルファリン体内動態の <i>in vivo</i> 薬物動態/薬力学的解析・ <i>in situ</i> 肝灌流試験による肝代謝能の解析	49
第四章	抵抗性ラットに於けるワルファリン高代謝能の 原因分子の同定	74
第五章	結語	96
欧文抄録	English abstract	100
参考文献		103
謝辞		112

略語一覽

3-OH-VKO	3-hydroxy-vitamin K epoxide
4'-OH	4'-hydroxywarfarin
6-OH	6-hydroxywarfarin
6PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase
7-OH	7-hydroxywarfarin
7OH-d5-warfarin	Phenyl-d5-7-hydroxywarfarin
8-OH	8-hydroxywarfarin
10-OH	10-hydroxywarfarin
%RE	Inter/intraday accuracy
%RSD	Inter/intraday precision
AAALAC	Association for Assessment and Accreditation of Laboratory
International	Animal Care International
ADME	Absorption, distribution, metabolism, and excretion
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
APCI	Atmospheric-pressure chemical ionization
AUC	Area under the curve
BCA	Bicinchoninic acid assay
C18	Octadecyl silyl column
CaCl ₂	Calcium chloride
CAR	Constitutive androstane receptor
cDNA	Complementary DNA
CDS	Coding sequence
C _{max}	Maximum concentration
cMOAT	Canalicular multispecific organic anion transporter 1
CPR	Cytochrome P450 reductase
CYP	Cytochrome P450
DTT	Dithiothreitol
DW	Distilled water
ELP3	Elongator complex protein 3
ER	Endoplasmic reticulum
ESI	Electrospray ionization
G6P	Glucose-6-phosphate
G6PD	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GGCX	Gamma-glutamyl carboxylase
Gla	Gamma glutamyl carboxylation
HEK293	Human embryonic kidney cells 293
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxidase
HSP27	Heat shock protein 27
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration
I.P.	Intraperitoneal
IUCN	International Union for Conservation of Nature
I.V.	Intravenous
K1-d7	Deuterium labelled vitamin K1
KCl	Potassium chloride
KH ₂	Vitamin K1 hydroquinone
K _m	Michaelis constant
KPB	Potassium phosphate buffer
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
MD	Molecular dynamics
MgCl ₂	Magnesium chloride
mRNA	Messenger RNA
MRP1	Multidrug resistance-associated protein 1
MS/MS	Tandem mass spectrometer
NaCl	Sodium chloride
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaHCO ₃	Sodium hydrogen carbonate
NaH ₂ PO ₄	Sodium dihydrogen phosphate
Na ₂ SO ₄	Sodium sulfate
NCA	Noncompartmental analysis
NPT	Isothermal–isobaric ensemble
NQO1	NAD(P)H quinone dehydrogenase 1
O-GlcNAc	O-linked β-N-acetylglucosamine
OPLS3	Optimized potentials for liquid simulations
P450	Cytochrome P450
PCR	Polymerase chain reaction

PDB	Protein data bank
P.O.	Per os (oral administration)
POPC	Phosphatidylcholine
PPP	Pentose phosphate pathway
PT-INR	Prothrombin time international normalized ratio
PVDF	Polyvinylidene difluoride
PXR	Pregnane X receptor
R5P	Ribose 5-phosphate
RMSF	Root mean square fluctuation
RPS-6	Ribosomal protein S6
R-rats	Warfarin-resistant black rats
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis
SD rat	Sprague-Dawley rat
SEM	Standard error of the mean
SIRT2	NAD-dependent deacetylase sirtuin 2
S-rats	Warfarin-susceptible black rats
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin
THP	Tris(3-hydroxypropyl)phosphine
TIP3P	Three-site transferrable intermolecular potential
T_{\max}	Time when concentration reach maximum value
UGT	UDP-glucuronosyltransferase
UV	Ultraviolet
VK	Vitamin K1 quinone
VKO	Vitamin K1 epoxide
VKOR	Vitamin K1 epoxide reductase
VKORC1	Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1
VKORC1L1	Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 like 1
VKR	Vitamin K quinone reductase
V_{\max}	Maximum velocity
V_{\max}/K_m	Enzymatic efficiency

図表一覧

図一覧

Fig. 1-1 : ビタミン K サイクル	13
Fig. 1-2 : 代表的な抗血液凝固系殺鼠剤の構造式	14
Fig. 2-1 : ジスルフィド結合選択的還元剤の構造式	28
Fig. 2-2 : VKOR の反応概略図	29
Fig. 2-3 : ラット VKOR モデル 1 (Cys43-Cys51、Cys132-Cys135) 立体構造	30
Fig. 2-4 : ビタミン K 類クロマトグラフ	33
Fig. 2-5 : VKOR 活性のミカエリス・メンテンプロット	36
Fig. 2-6 : VKOR 活性のワルファリンによる阻害曲線	37
Fig. 2-7 : Vkorc1 遺伝子の変異前後の配列	38
Fig. 2-8 : 抵抗性群・感受性群でのミカエリス・メンテンプロット	39
Fig. 2-9 : 抵抗性群・感受性群でのワルファリンによる VKOR 活性阻害曲線	40
Fig. 2-10 : VKORC1 のイムノブロッティング	42
Fig. 2-11 : VKOR とワルファリン/VKO のドッキングポーズ	43
Fig. 2-12 : VKOR とワルファリンの相互作用 2D 図	45
Fig. 2-13 : VKOR と VKO の相互作用 2D 図	46
Fig. 2-14 : ワルファリンと VKOR Phe55 間の距離	47
Fig. 2-15 : VKOR の平方根平均二乗揺らぎ	48
Fig. 3-1 : ラットに於けるワルファリン水酸化代謝経路	58
Fig. 3-2 : ワルファリンと水酸化ワルファリンのクロマトグラフ	59
Fig. 3-3 : ワルファリンの薬力学的解析	61
Fig. 3-4 : 血漿中ワルファリン濃度の推移 (経口投与)	62
Fig. 3-5 : 血漿中ワルファリン濃度の推移 (静脈内投与)	63
Fig. 3-6 : 血漿中水酸化ワルファリン濃度の推移 (経口投与)	64
Fig. 3-7 : 血漿中水酸化ワルファリン濃度の推移 (静脈内投与)	65
Fig. 3-8 : ワルファリン投与 51 時間後の肝臓、腎臓中ワルファリン濃度	69
Fig. 3-9 : 尿中へのワルファリン・水酸化ワルファリン排泄量	70
Fig. 3-10 : 肝灌流試験での灌流液中水酸化ワルファリン濃度の推移	71
Fig. 3-11 : シトクロム P450 のイムノブロッティング	73
Fig. 4-1 : シトクロム P450 の酸素添加反応機構	83
Fig. 4-2 : NADPH からの P450 への電子伝達経路概略図	84
Fig. 4-3 : ペントースリン酸経路の酸化的経路	85

Fig. 4-4 : ワルファリン代謝活性ミカエリス・メンテンプロット (ミクロソーム)	87
Fig. 4-5 : ワルファリン代謝活性ミカエリス・メンテンプロット (S9)	88
Fig. 4-6 : シトクロム P450 還元酵素 (CPR) 活性	91
Fig. 4-7 : ペントースリン酸経路による NADPH 産生活性	92
Fig. 4-8 : NADPH 産生酵素のイムノブロッティング	93
Fig. 4-9 : 各測定法に於けるワルファリン水酸化代謝能の比較	94
Fig. 4-10 : グルコース 6 リン酸脱水素酵素 (G6PD) の翻訳後活性調節機構	95

表一覧

Table 1-1 : 日本に於けるネズミによる農作物被害額	12
Table 2-1 : 世界各地の抵抗性齧歯類が保有する VKOR 変異	31
Table 2-2 : ラット Vkorc1 遺伝子配列解析に用いたプライマー配列	32
Table 2-3 : ビタミン K 類の HPLC-APCI-MS/MS 分析条件、分析精度	34
Table 2-4 : VKOR 酵素速度論的パラメーター	35
Table 2-5 : 抵抗性群・感受性群の VKOR 酵素速度論的パラメーター	41
Table 2-6 : ドッキングシミュレーションによるスコアリング	44
Table 3-1 : ワルファリンと水酸化ワルファリンの分析条件・分析精度	60
Table 3-2 : ワルファリンの薬物動態学的パラメーター	66
Table 3-3 : 水酸化ワルファリンの薬物動態学的パラメーター (経口投与)	67
Table 3-4 : 水酸化ワルファリンの薬物動態学的パラメーター (静脈内投与)	68
Table 3-5 : 灌流液中水酸化ワルファリン濃度-時間曲線下面積 (AUC)	72
Table 4-1 : ラット G6PD シークエンス解析プライマー配列	86
Table 4-2 : ワルファリン代謝活性酵素速度論的パラメーター (ミクロソーム)	89
Table 4-3 : ワルファリン代謝活性酵素速度論的パラメーター (S9)	90

— 第一章 —

序論

ネズミ駆除の必要性

ネズミ目／齧歯目 (*Rodentia*) は 2200 種以上から構成され現生哺乳類の約 40% を占める哺乳類中最大のグループである [1]。このうち、ドブネズミ (*Rattus norvegicus*)、クマネズミ (*Rattus rattus*)、ハツカネズミ (*Mus musculus*) の 3 種は人間社会と生活圏を共にする事からイエネズミと総称される [2]。これらイエネズミは下記に示すような種々の経済的、衛生的被害を生じるためにしばしば害獣として認知される。

まず、経済上の被害として農作地に於ける農作物や小売店・レストランに於ける食品の食害が挙げられる。農林水産省の調査では 2010 年から 2018 年までに国内で合計 15 億円を超えるネズミに由る農作物被害が確認されている (Table 1-1) [3]。また、食品加工工場に於ける加工製品中への糞尿・死体等の混入や、ケーブル類を齧る事で生じるビル火災等、ネズミの建築物への侵入は時に大規模な経済的損失を生じる可能性もある。一方、衛生上の懸念としては齧歯類が感染症を媒介する事が挙げられる。動物から人間に感染する疾病を人獣共通感染症と呼ぶが、この内レプトスピラ症、ハンタウイルス肺症候群等、20 種類以上の感染環に齧歯類が関与する [4]。特に、ネズミ・ノミが媒介する *Yersinia pestis* により引き起こされるペストは、2017 年にマダガスカル島で流行し 100 人以上が死亡する大規模なインシデントとなった [5]。このような感染症のアウトブレイクに対しては媒介動物であるネズミの駆除が感染拡大防止に於いて必須となる。

また、これらイエネズミはヒトの移動や物流に伴い外来動物として生息域を広げ、その繁殖力の高さから生態系を攪乱する事もある [6]。例えば、南太平洋のイギリス領ゴフ島は IUCN レッドリスト絶滅危惧 IB 類であるズキンミズナギドリ (*Pterodroma incerta*) の数少ない繁殖地の一つであるが、これらの卵・雛が外来ネズミに食害されている事が確認されている [7]。日本では、2011 年に世界自然遺産に登録され、その固有の生態系から「東洋のガラパゴス」とも呼称される小笠原諸島で外来ネズミの侵入が問題となっている。小笠原諸島でも外来ネズミの消化管から野鳥の筋肉・羽毛が確認され、実際に固有種の食害が生じている事が判明している [8]。このように、経済、公衆衛生、環境保全の観点からネズミの駆除が必須となる事例は多い。ネズミ駆除の手法はかご罠、粘着トラップ等による物理的駆除と毒餌＝殺鼠剤の散布による駆除という 2 つに大別される。前者は家屋等、屋内での小規模の駆除には事足りる反面、より大規模な範囲での個体群レベルのコントロールに対しては効力が十分でない事が多く、殺鼠剤の散布が必要となる。

抗血液凝固系殺鼠剤

殺鼠剤によるネズミ駆除の歴史は古く、1800年代後半には既にストリキニーネが殺鼠剤として使用された記録がある他、ユリ科の植物である赤色海葱 (*Drimys maritima*) から抽出される強心配糖体アルカロイドのシリロシドや神経毒性を有する金属であるタリウム等も殺鼠剤として使用されてきた [9]。しかしながらこれらはいずれも急性毒であり、ヒトや標的外生物が誤食した際の危険性が高いという欠点があった。このため、環境中への大規模な散布に際しては、ビタミン K の投与で解毒可能な抗血液凝固系殺鼠剤が最も広く使用されてきた。

抗血液凝固系殺鼠剤の発見は 1930 年代に米国で発生したウシの出血性疾患に起因する。ウィスコンシン大学のリンク博士らの研究により、その原因物質はスイートクローバー中に含まれるクマリンがカビにより変性したジクマロールだと判明した [10]。この化学物質を基に合成されたクマリン系殺鼠剤がワルファリンである。ワルファリンやインダンジオン誘導体はビタミン K エポキシド還元酵素 (VKOR) を阻害する事で出血毒性を発揮する (Fig.1-1)。ビタミン K は γ グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX) の補因子として働き、ビタミン K 依存性タンパク質中の特定のグルタミン酸残基を γ カルボキシグルタミン酸 (Gla) へ変換する際に不可欠な栄養素である。そしてこの反応により酸化・不活化されたビタミン K エポキシド (VKO) を還元しリサイクルする事が VKOR の役割である [11]。ビタミン K の供給源として植物が合成するフィロキノン (ビタミン K1) と腸内細菌の産生や食肉中に含まれるメナキノン (ビタミン K2) の大きく 2 つがあるが、肝臓での蓄積量は生理的な要求量より低い肝重量 (g) あたり pmol オーダーであり、正常な血液凝固能を保つには VKOR によるビタミン K のリサイクルが必須である [12]。殺鼠剤による VKOR 活性の阻害はビタミン K 依存性血液凝固因子 (第 II、VII、IX、X 因子) を枯渇させ血液凝固時間を延長させ、最終的に消化管や肺等からの出血毒性が生じる。また、GGCX は骨基質タンパク質であるオステオカルシンやマトリックス Gla タンパク質の Gla 化も行い骨石灰化の促進や細胞増殖等にも関与する [13]。

しかしながら、ワルファリンの度重なる使用でこれらに抵抗性を示すネズミ、所謂スーパーラットが出現した。1958 年にスコットランドで最初の抵抗性ラットが確認された [14] のを皮切りに、ヨーロッパ各国、北米、オーストラリア、アジア諸国と世界各地でその存在が確認されている。日本でも 1980 年代に最初の抵抗性ネズミが東京で確認されて以降、大阪や福岡など各地で報告されており、東京ではその 8 割を抵抗性群が占めるという報告もある [15,16]。抵抗性齧歯類への対策としてジフェナクム、ブロジファクムといった体内の蓄積性・毒性を強化した第二世代抗血液凝固系殺鼠剤が開発された (Fig.1-2) [17]。しかしながら、第二世代殺鼠剤はその毒性の強さ

から非対象生物での中毒事例が絶えない。野生動物においては 1980 年以降 7000 件以上の殺鼠剤散布による死亡事例が確認され、そのうち 70%以上が希少性の高い猛禽類である [18]。また、第二世代殺鼠剤に対しても抵抗性を有するネズミが既に確認されている [19]。つまり、安全かつ抵抗性ラットにも有効な殺鼠剤は現状存在しない。この要求を満たす新規殺鼠剤を開発するには抵抗性メカニズムの解明が必要である。

抵抗性の分子生物学的メカニズム

殺鼠剤抵抗性齧歯類自体は 1950 年代から確認されてきたものの、殺鼠剤標的分子 VKOR をコードする遺伝子 VKORC1 (VKOR complex subunit1) が 2004 年に同定されるまでその抵抗性獲得機序は不透明であった [20]。この報告を受けて、フランスの抵抗性ラットの VKOR では 139 位のチロシンがフェニルアラニンに変異している事が判明した [21]。これ以降、イギリスやドイツ・ベルギーなどヨーロッパや中国・韓国等で発見された抵抗性齧歯類は 139 位のチロシンがフェニルアラニン或いはシステイン、セリンに変異している事が判明した [22,23]。VKOR 中のワルファリンの結合サイトの一つは 138-140 位のアミノ酸領域だと考えられており、本変異により殺鼠剤との結合性が低下していると見なされている。一方、58 位や 128 位等、139 位以外の変異パターンでも抵抗性を生じ得る事が確認されている [24,25]。また、我が国では 139 位の変異は確認されておらず、41 位、58 位、61 位、76 位等に変異を持つ抵抗性群が確認されている [26]。

このように、世界各地で多様な変異パターンが確認されているが、これらの変異 VKOR の殺鼠剤感受性を調べると、それぞれ異なる阻害率を示しており、中には変異があるにも拘らず生体レベルでは抵抗性を示さない変異パターンも存在する [27]。このため、現状、結合サイト付近の変異は抵抗性を生じる可能性が高いと言えるが、それ以外の変異が抵抗性に寄与するかを判断する体系的な基準はなく、それぞれの変異に対して表現型や構造に与える影響を評価する必要がある。一方、VKOR 変異を持たないにも拘らず抵抗性を示す個体群等も確認されている [28]。また、VKORC1 のパラログとして VKORC1 like 1 (VKORC1L1) も発見されているが、VKORC1L1 はラットでは血液凝固因子産生を担う肝臓中での発現量が低く、肝臓以外での酸化ストレス応答等に関与すると考えられている [29]。

VKOR 変異以外の抵抗性獲得の原因としては体内動態の変化が挙げられる。体内動態は主に吸収 Absorption 分布 Distribution 代謝 Metabolism 排泄 Excretion という要素で構成される (ADME)。これら ADME に関与する因子の変異、例えば吸収率の低下や代謝排泄能の向上といった表現型を齎す変異は薬効発現を低下させる可能性がある。この内、特に薬物代謝酵素シトクロム P450 (CYP、P450) は医薬品のうち 7 割

程度の代謝に関与すると呼ばれる重要な薬物代謝酵素であり、ワルファリンの代謝も担う事が知られている [30]。

殺鼠剤抵抗性齧歯類についても、第二世代殺鼠剤ブロマジオロン散布地域のドブネズミでは P450 発現量が高い傾向にあるという報告 [31]や、東京のクマネズミでは肝臓中 CYP3A2 発現量が高く、また、P450 によるワルファリン代謝能が向上していた [32]。ほか、第二世代殺鼠剤が高頻度で散布されている田園地域に生息するカリフォルニアハタネズミ (*Microtus californicus*) の肝臓中酵素画分を用いた *in vitro* 試験では殺鼠剤の代謝能が向上している事が判明した [33]。このように、P450 による解毒代謝能の向上という要素も殺鼠剤抵抗性に寄与する可能性がある。

本研究の目的

上述のように、殺鼠剤抵抗性には標的分子 VKOR の変異や P450 の活性向上という要素に関与する事が報告されているが、これらの解析の大部分がその個々の要素に着目したものであり、抵抗性ラットの VKOR、体内動態を包括的に観察した研究は限られている。その原因の一つに野生齧歯類を用いた研究が、サンプルの入手や動物のコンディション、個体差を考慮すると再現性を得難いという側面がある。また、捕獲した野生齧歯類は体内に保有する病原菌や疾病の影響が不透明である上、捕獲・実験に供試するまでに曝露されてきた環境中化学物質の影響も評価不可能であることも実験を困難としている。実際に、P450 は分子種にもよるが外来化学物質の曝露によりその遺伝子発現量が数十倍にも変化する事が知られている [34]。このため、常に環境化学物質に曝露されている野生齧歯類を用いて抵抗性メカニズムの詳細な解析を行うには制限があった。

これに対し、本研究では東京、新宿で捕獲した抵抗性クマネズミを5年間以上飼育する事によりクローズドコロニー化し、抵抗性ラットとしての表現型を保ちつつも外部要因を排除した実験系の実施を可能とした [35]。本研究はこの抵抗性ラットクローズドコロニーを用い代表的な抗血液凝固系殺鼠剤であるワルファリンへの応答を多角的に解析する事で殺鼠剤抵抗性メカニズムの解明を目指した。

本論文の構成

本論文は齧歯類における抗血液凝固系殺鼠剤に対する抵抗性について概説した本章(第一章)に続き、第二章から第四章は実験の部にあたる。

第二章では抗血液凝固系殺鼠剤の標的分子である VKOR について、*in vitro* での酵素速度論的解析と *in silico* での結合性シミュレーションにより東京で頻発している Leu76Pro 変異が VKOR に与える影響を評価した。第三章では *in vivo* での薬物動態・

薬力学的解析と *in situ* 肝灌流試験により殺鼠剤の解毒代謝・排泄能が亢進している事を解明した。続く第四章では生体で観察された高代謝能の原因について精査し、その原因が代謝を直接担う解毒代謝酵素シトクロム P450 の変異ではなく、その電子供与源であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) を産生するペントースリン酸経路の活性化である事を解明した。

第五章では、上記の実験系から得られた知見に基づき、殺鼠剤抵抗性獲得機序の更なる解明と、その対策に向けた考察と今後の展望を述べた。

Table 1-1：日本に於けるネズミによる農作物被害額

年度	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	合計
被害額 (百万円)	117	285	689	70	76	78	64	124	72	1575

農林水産省農村振興局農村政策部農村環境課鳥獣対策室作成『農作物被害状況 別添
2 野生鳥獣による農作物被害の推移』から各年度のネズミの項を抜粋 [3]。

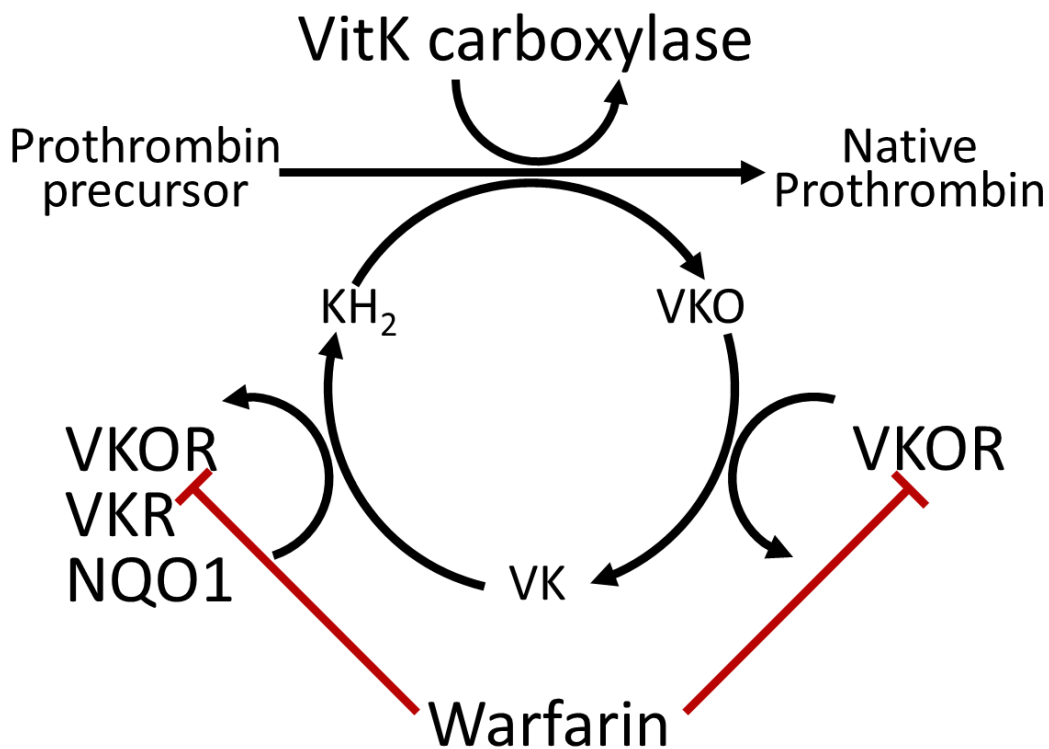
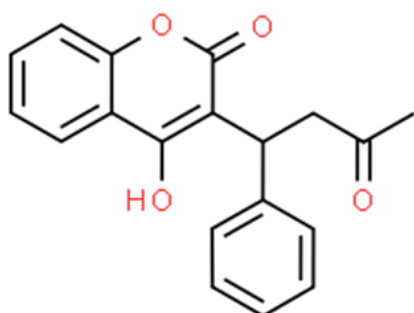


Fig. 1-1：ビタミンKサイクル。ビタミンKハイドロキノン (KH₂) は、GGCX によるグルタミン酸のγ-カルボキシグルタミン酸への変換の補因子として機能する。本反応により、KH₂はビタミンKエポキシド (VKO) に酸化される。VKORはVKOからビタミンKキノン (VK) への還元反応を担う。ワルファリン等抗血液凝固系殺鼠剤はビタミンKエポキシドをビタミンKキノンへ変換するVKORを阻害する事で出血毒性を発揮する。

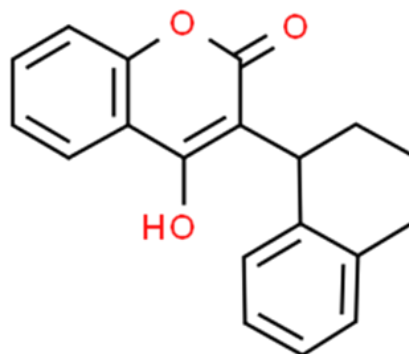
しかしながら VKOR はビタミンKキノンをハイドロキノンへ変換する力は弱く、この反応を担う未同定のビタミンK還元酵素 (VKR) が存在すると予想されている。従来、この反応は NAD (P) H キノンオキシドレダクターゼ 1 (NQO1) が担うと考えられてきた。しかしながら、NQO1 は合成型ビタミンKであるメナジオン (ビタミンKの炭素鎖を持たない化合物) の還元能は示すものの、ビタミンK本体のキノン体からハイドロキノンへの還元能は極めて低い事が報告されている [36]。このため、生体内ではNQO1はこの反応に関与しないという見解が近年では支配的である [37]。VKOR：ビタミンKエポキシド還元酵素、VKR：ビタミンKレダクターゼ NQO1：NAD (P) H キノンオキシドレダクターゼ 1、KH₂：ビタミンKハイドロキノン、VKO：ビタミンKエポキシド、VK：ビタミンKキノン。GGCX：γ-グルタミルカルボキシラーゼ

クマリン系第一世代殺鼠剤

Warfarin

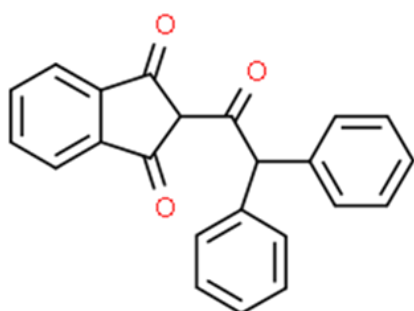


Coumatetralyl

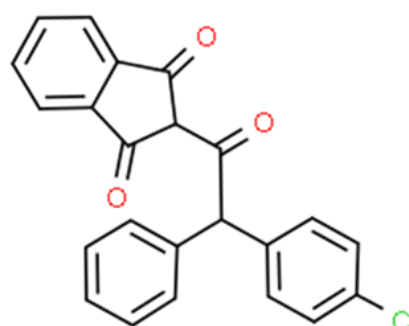


インダンジオン系殺鼠剤

Diphenadione

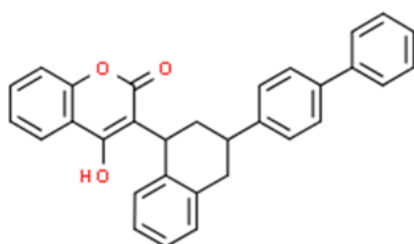


Chlorophacinone



クマリン系第二世代殺鼠剤

Difenacoum



Brodifacoum

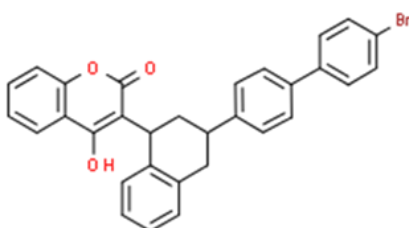


Fig. 1-2：代表的な抗血液凝固系殺鼠剤の構造式。各構造は Chemspider.com より取得した。

— 第二章 —

Leu76Pro 変異 VKOR の *in vitro* 酵素速度論的解析・ *in silico* 結合性シミュレーションによる解析

背景

ワルファリン等の抗血液凝固系化合物はビタミン K エポキシド還元酵素 (VKOR) を阻害する事でビタミン K 依存性血液凝固因子の枯渇を生じ、血液凝固時間を遅延させる。本作用を利用しワルファリンは殺鼠剤或いは医薬品として用いられている。そして、VKOR をコードする VKORC1 遺伝子には多数の遺伝子変異が報告されており、ワルファリン感受性に影響を及ぼす事が知られている。ヒトの臨床現場に於いては VKORC1 遺伝子多型がワルファリン治療域の個人差の主要な原因の一つになる。現在までに 26 の遺伝子多型がヒトに於いてワルファリン抵抗性に寄与する事が確認されており、これらを有する患者には約 2~7 倍の投与量が必要となる [38]。殺鼠剤抵抗性齧歯類についても第一章で述べたように種々の遺伝子変異が抵抗性齧歯類で確認されている。ワルファリンの適切な運用に際しては、各変異が VKOR 活性・ワルファリン感受性に与える影響を解析する事が重要である。

しかしながら、VKOR の生体内での反応機構については未解明な点が多く、哺乳類 VKOR の還元反応への生理的な電子供与体は未同定である。このため、典型的なジスルフィド結合還元剤であるジチオスレイトール (DTT) が *in vitro* での VKOR 反応の還元剤として使用されてきた [39]。しかしながら、DTT は VKOR の酵素反応を超えて VKO を VK に直接還元する上に副産物として 3-OH-VKO を生成する事が確認されている。このため、*in vitro* での VKOR 活性試験に DTT を使用する事は適切でない可能性があるとして指摘されている [40]。さらに、DTT を用いた阻害試験が与える IC_{50} 値はいくつかの VKOR 変異体で *in vivo* の感受性評価と一致しなかったという報告もある [41]。以上から、より生理的な活性を反映した VKOR アッセイ系の構築が求められている。

DTT に代わるジスルフィド結合還元剤の候補として、Tris(3-hydroxypropyl)phosphine (THP) が発見された (Fig. 2-1) [42]。本物質は水溶性かつ空気中で安定な選択的ジスルフィド結合還元剤化合物である。Kretzler らは THP の *in vitro* VKOR レドックスパートナーとしての可能性を検討した所、THP は VKO を直接還元せずに DTT と匹敵する VKOR 活性能を示したと報告した [43]。ただし、VKOR の酵素速度論的解析及び、殺鼠剤阻害試験に THP を適用したという報告は限られている。

また、構造情報についても哺乳類の VKOR の実験的な構造解析は成功しておらず、現在まで VKOR の結晶構造解析はバクテリア (*Synechococcus*) の VKOR ホモログからしか得られていない (タンパク質構造データベース PDB: 3KP9) [44]。このため、ヒト・齧歯類等哺乳類の VKOR の研究では、この立体構造をベースとしたホモロジーモデルが用いられている。哺乳類の VKOR は 4 回膜貫通型の小胞体膜タンパク質だと考えられており、膜貫通部位である 4 つのヘリックス構造と膜外に存在する各ヘリックスを繋ぐループ状構造 (ER ループ) で構成される。VKOR の還元活性は 2 つのジスルフィド結合のシステインを介して行われると考えられており、これを構成する 4 つのシステイン (Cys43、Cys51、Cys132、Cys135) は生物種を超えて保存されており CXXC モチーフと呼ばれる (Fig. 2-2)。

また、VKOR 結合ポケット中には 3 か所のワルファリン結合部位があると考えられている。最初に提唱された結合部位は、4 番目のヘリックスにある Thr138、Tyr139、Ala140 からなる TYA モチーフである [45]。当初は TYA モチーフが唯一の結合部位であると考えられていたが、Czogalla らにより、55 位フェニルアラニンが最も強力な結合部位であり、これをアラニンと置換するとワルファリンが全く阻害能を発揮しなくなる事が発見された [46]。また、Czogalla らは VKO とワルファリンはこの 55 位の結合で競合するという仮説を提唱した (Fig. 2-2)。また、抵抗性変異がループ構造中の 30 位周辺に存在する事から 30 位近辺にもう一つ結合部位がある可能性も示唆されている。実際に、ワルファリン耐性型の変異のほとんどは、Lys30、Phe55 および Thr138 の近傍に存在する (Table2-1) [27,47-50]。

しかし、東京の抵抗性群で多くみられる Leu76Pro 変異は ER ループ内にあり、上記の結合サイトと活性中心の両方から離れた位置に存在している (Fig.2-3)。ヒトに於いてもこの ER ループ部位の変異 (71、77 位) が抵抗性を引き起こすという報告がある [51]。しかしながら、これらの変異体の VKOR 活性は、古典的な DTT での VKOR アッセイでの検出域よりも低かったために IC_{50} 値を測定する事は不可能だった [26]。さらに、これらの突然変異がどのような構造的変化により抵抗性に寄与しているかは不透明である。したがって、ER ループ内の変異の機能的および構造的影響を評価する必要がある。

そこで、本研究では、THP を電子供与体として用いた VKOR の *in vitro* 酵素速度論的解析・殺鼠剤感受性評価法と液体クロマトグラフィー質量分析法を用いたビタミン K の定量法を確立すると共に、本法と *in silico* 結合性シミュレーションを用いて Leu76Pro 変異が VKOR の活性・ワルファリン感受性・構造に与える影響の評価を試みた。

方法

使用動物

Sprague-Dawley (SD) ラットは日本 SLC (静岡) から導入し、一週間の馴化期間を設けた。クローズドコロニー化されたワルファリン抵抗性及び感受性クマネズミ (*Rattus rattus*) はイカリ消毒株式会社 (東京) から供試された。実験に用いたラットは全てオスであり、平均体重は 120.4 ± 10.5 g であった。また、水晶体の乾燥重量から算出した推定年齢は 180.5 ± 40.2 日齢であった [52]。これらは 12 時間の明暗周期、 $20^{\circ}\text{C} \sim 23^{\circ}\text{C}$ の室温で飼育し、餌 (CE-2、日本クレア、東京)・水は自由摂取とし、実験前の絶食は実施しなかった。

これらのラットはイソフルランの過剰摂取により安楽死させ、その後直ぐに肝臓を摘出し液体窒素で凍結させた。これらの肝サンプルは実験に供試するまで -80°C で保管した。以上の動物実験及び飼育は国際実験動物ケア評価認証協会 (The Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, AAALAC International) のガイドラインに従っており、北海道大学全学及び大学院獣医学研究院の認証を得て実施した (認証番号 18-0150)。

VKORC1 シークエンス解析

上記の抵抗性クマネズミ (R-rats) と感受性クマネズミ (S-rats) の *Vkorc1* コーディング領域配列 (CDS) を取得した。ゲノム DNA はこれらの肝サンプルから Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI) でメーカーの標準的プロトコルに従い抽出した。*Vkorc1* の CDS を含む領域を PrimeSTAR MAX DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社、滋賀) を用いた PCR で増幅した。PCR は $94^{\circ}\text{C}/5$ 秒、 $60^{\circ}\text{C}/5$ 秒、 $72^{\circ}\text{C}/15$ 秒、35 サイクルの条件で実施した。本 PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN N.V., Hilden, Germany) で精製した後に、シークエンス解析に供試した (株式会社ファスマック、神奈川)。*Vkorc1* 遺伝子のアライメント解析は MEGA7 を用い Clustal W アルゴリズムで実施した [53]。上記の試験系で用いたプライマーの配列情報は Table 2-2 に記載した。

マイクロソーム画分調製

VKOR が含まれるマイクロソーム画分をラット肝サンプルより調製した [54]。約 3.0 g の肝臓を 9.0 mL の氷冷 0.1 M リン酸カリウムバッファー (KPb、pH 7.4) でホモジナイズした。ホモジナイズ液は 4°C 、 $9,000 \times g$ で 20 分間遠心した。この上清をガーゼで濾した後に 4°C 、 $105,000 \times g$ で 60 分間超遠心した。ペレットを 0.1 M KPb に溶解し、濃度を 10 mg/mL に調製した後、液体窒素で凍結させ使用時まで -80°C で保管した。タンパク質濃度は Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham,

MA) で測定した [55]。

ビタミン K エポキシドの合成

In vitro VKOR 酵素速度論的解析の基質として用いたビタミン K1 エポキシド (VKO) はビタミン K1 キノン (VK) を実験的に酸化して取得した [56]。100 mg の VK を 5 mL のエタノールに溶解し、三角フラスコ中で 75°C、2 分間インキュベートした。これに 0.25 mL の DW に溶解した Na₂CO₃ 100 mg と過酸化水素 1 mL を加え、75°C で 10 分間激しく振盪した。室温で 5 分間冷却の後、DW 10 mL を加えた本溶液を 50 mL の遠心チューブ 2 本に分注し、各 20 mL のジエチルエーテルを添加して 10 分間激しく振盪した。3,000 ×g で 10 分間遠心し、VKO を含むエーテル層 (上清) を回収し、遠心エバポレーターで減圧蒸留を行い乾固させた。

本行程を 2 回繰り返した後の VKO 含有溶液から高速液体クロマトグラフィー紫外吸光計 (HPLC-UV) で VKO 画分を分取、精製した。ポンプは PU-980 (日本分光株式会社、東京) に C18 カラム (Inertsil PREP-ODS、30.0 × 250 mm、GL サイエンス、東京) と RP-18GP ガードカラム (関東化学株式会社、東京) を接続して用い、270 nm の紫外吸光での検出は SPD-6AV (島津製作所、京都) で行った。移動相は 97% メタノールを 10 mL/min の流量で使用した。分取した VKO は再度遠心エバポレーターで乾固させ、99.5% エタノールに溶かして VKO 溶液とし、*in vitro* 試験での基質として用いた。本 VKO 溶液中の VKO 濃度は後述の質量分析計を用いた手法で測定した。

VKOR 活性試験

THP を用いた VKOR の酵素速度論的解析を行った。1.0 mg/mL の SD ラットミクロソーム画分と 5、10、25、50、100、300、750 μM の VKO を含む反応液を HEPES バッファー (0.1 M, pH 7.4) で調製した (いずれも終濃度、容量 100 μL)。これらのサンプルはウォーターバスで 37°C、5 分間振盪しながらプレインキュベーションした。その後 THP あるいは DTT (1 mM、終濃度) を添加し反応を開始した。20 分間のインキュベーションの後、氷冷ジエチルエーテル 1 mL を添加し反応を停止した。また、阻害試験は 50 μM の VKO と 0、0.01、0.05、0.1、0.25、0.5、1 μM のワルファリンナトリウムを含む反応液を用いて実施した。各サンプルの測定はデュプリケイトで行った。各還元剤による直接的な VKO の還元反応はミクロソーム非添加の反応液で同様の手法により測定し、各サンプルの値から差し引いた。抵抗性群と感受性群についても THP を用いて上記の手法で解析を行った。

ビタミン K 類の反応液からの抽出は液液分配法にて実施した。反応液に内部標準物質としてビタミン K1-d7 を添加した (100 nM、終濃度)。これに 1 mL の HEPES

バッファー、5 mL のジエチルエーテルを加え、激しく振盪後 3,000 × g、10 分遠心し液液分配を行った。上清であるジエチルエーテル画分を分取後、窒素濃縮機で乾固させた。本液液分配は 2 回実施した。残渣は 0.2 mL のメタノールで再溶解し褐色バイアルに入れ分析に供試した。ビタミン K 類は感光性のため、一連の作業は遮光下で褐色・蓋付試験管を用いて実施した。

ビタミン K 類の検出

ビタミン K 類の検出・定量は HPLC (Shimadzu 20 series、株式会社島津製作所) ー大気圧化学イオン化トリプル四重極質量分析計 (APCI/MS/MS、LC-8040、島津製作所) で行った。HPLC 分析条件は須原らの手法に従い、C18 カラム (Inertsil ODS-3、2.1 × 150 mm、5.0 μm、GL サイエンス) を用い行った [57]。移動相は A 相：95 % のメタノールと 5 % 酢酸溶液 (0.1 % v/v)、B 相：99.5 % エタノールを用い、B 相濃度 0 ~ 100% の 10 分間のグラジエントで実施した。流量は 0.4 mL/min、インジェクション量は 10 μL、カラム温度は 45°C とした。分析用の標準品として、ビタミン K1 キノン は関東化学株式会社から、ビタミン K1 エポキシドは Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO) から、ビタミン K1-d7 は MPD Chemicals (Ambler, PA) から入手した。質量分析の条件は Table 2-3 に示した。

分析のクオリティコントロール

液液分配によるビタミン K の回収率を調べるために、肝ミクロソーム画分を用いた添加回収試験を実施した。肝ミクロソーム画分 0.1 mg を含む 1 mL の HEPES バッファーにビタミン K 類の標準品を 100 μL 添加した (各 100 nM、終濃度)。その後、上記の手法を用いて液液分配、分析を実施した。この手順を 4 回繰り返し、回収率を算出した。検出限界 (LOD) および定量下限 (LOQ) は標準曲線 (n=8) から算出した。

ウェスタンブロット

ミクロソーム中の VKORC1 タンパク質発現量はウェスタンブロット法にて半定量した。ミクロソーム画分は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離した [58]。アプライ量は 20 μg/lane で 4-20% グラジエントゲルを使用した。分離後のタンパク質は 0.2 μm PVDF メンブレンにセミドライ法にて転写した。ブロッキングはプロテインフリーブロッキングバッファー (タカラバイオ) 中で室温、1 時間実施した。免疫反応は SNAP i.d. (Merck Millipore, Burlington, MA) で実施した。一次抗体は anti-VKORC1 抗体、ローディングコントロールとして anti-RPS-6 抗体を用い、二次抗体は HRP 標識 anti-マウス IgG 抗体 (いずれも Abcam, Cambridge, UK) を用い

た。検出は Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

ドッキングシミュレーション

各 VKOR の 3D ホモロジーモデルは BIODIA Discovery Studio (Dassault Systèmes S.E., Paris, France) で作成した。各 VKOR について、Model1 (Cys43-Cys51、Cys132-135 ジスルフィド結合) と Model2 (Cys51-Cys135) の 2 つを作成し、エネルギー最小化は CHARMM 力場を用いて実施した [59]。

これら VKOR 立体構造と低分子リガンド (ワルファリン・VKO) のドッキングシミュレーションは Schrödinger Small Molecule Discovery suite (Schrödinger, New York, NY) を用い下記の通りに実施した。各構造に水素分子を添加し、pH 7.0 ± 2.0 の条件下で最適なイオン化状態を LigPrep 機能で構築した。VKOR の結合ポケットは 10 Å × 10 Å × 10 Å のグリッドボックスで定義した。ボックスの中心はホモロジーモデル中の生理的基質 (ビタミン K) に合わせた。ファンデルワールス半径のスケールリング因子は 0.8 とし、OPLS3 力場をグリッド生成に用いた [60]。残りのパラメーターはデフォルト設定を適用した。ワルファリンと VKO は本結合ポケットに GLIDE 機能の standard precision スコアリングを用いドッキングした [61]。本研究では Glide Docking Score と Glide eModel スコアを結合状態の評価に用いた。docking スコアはリガンド-タンパク質間の結合力の評価に、eModel スコアはリガンド-タンパク質複合体構造の確かさの指標として用いられる [62]。

分子動力学シミュレーション

上記で構築したワルファリン-VKOR、VKO-VKOR の結合状態の動的な評価を Desmond software (D.E. Shaw Research, New York, NY) で実施した [63]。ドッキングシミュレーションで最も良いドッキングスコアを示した結合状態を初期配置として用い、TIP3P 溶媒モデルと POPC 脂質膜モデルを構築した。エネルギー最小化を OPLS3 力場で実施し、10 Å 直方晶系の全分子シミュレーションをワルファリンでは 50 ns、VKO では 100 ns 間実施した。計算時間間隔は 1.0 fs とし、1.0 ps に統合しアウトプットした。温度、圧力設定は 300 K、1.01 bar の NPT アンサンブルを適用した。その他のパラメーターはデフォルト設定を用いた。

統計解析

上記の *in vitro* 酵素速度論的解析で得た活性値はミカエリス・メンテン式、或いは阻害曲線に非線形回帰した。これを基に V_{max} 、 K_m 、 V_{max}/K_m 、 IC_{50} 値を GraphPad Prism 8 software で算出した (GraphPad Software Inc., San Diego, CA)。これらのパラメーターの検定は Student *t*-test で有意水準 $p < 0.05$ で実施した (JMP 14, SAS Institute, Cary,

NC)。

結果

HPLC-APCI-MS/MS によるビタミン K の検出

ビタミン K1 とビタミン K1 エポキシド、また、内部標準物質としてビタミン K1-d7 の検出を HPLC-APCI-MS/MS で行った。各化合物のクロマトグラムを Fig. 2-4 に、測定精度の指標となる回収率、検出限界・定量下限を Table 2-3 に示した。

THP を用いた VKOR 酵素速度論的解析

THP、DTT 双方を用いた予備試験にて反応液中のマイクロソーム濃度とインキュベーション時間が直線性を保持する範囲を確認した上で、1 mg/mL のマイクロソーム濃度、1 mM の還元剤と 20 分のインキュベーション時を研究全体で適用した (data not shown)。5、10、25、50、100、300、および 750 μ M の VKO 濃度、SD ラットの肝マイクロソームで VKOR のミカエリス・メンテン式への非線形回帰を行った (Fig. 2-5)。その結果、THP、DTT 双方の還元剤でミカエリス・メンテン曲線への良好な回帰を示し、最大濃度 750 μ M の VKO でプラトーに達した。Table 2-4 にこの回帰で計算された最大反応速度 (V_{max})、ミカエリス定数 (K_m)、および酵素効率 (V_{max}/K_m) といったミカエリス・メンテンパラメーターを示す。DTT は THP よりも高い VKOR 活性を示し、 V_{max} と K_m が有意に高くなった。但し、2 つの還元剤間で、 V_{max}/K_m (酵素効率) に有意差は認められなかった。

また、これら 2 つの還元剤を用い 50 μ M の VKO 濃度でワルファリンによる阻害試験を実施した。上記の様に DTT は高い VKOR 活性を示したが、両方の還元剤でワルファリン濃度依存性に典型的なシグモイド曲線が描写できた (Fig. 2-6 A)。興味深い事に図 1-C に示すように、ワルファリン非添加時の各 VKOR 活性を 100%とした相対活性値で表示すると、2 つの還元剤で完全に同じ阻害曲線となり、 IC_{50} 値に有意差はなかった (Fig. 2-6 B、Table 2-4)。

VKORC1 の配列解析

Fig. 2-7 は、VKORC1 の CDS とアミノ酸配列を示している。227 位での塩基置換 (T→C) は、76 位ロイシンからプロリンへのミスセンス変異を齎した。このアミノ酸変異は、二～四章の実験で用いた全ての抵抗性ラットで検出された。

抵抗性群での VKOR 酵素速度論的解析

THP を還元剤として感受性群 (S-rats) と抵抗性群 (R-rats) の双方で VKOR 活性の酵素速度論的解析を行った。感受性群は 10~750 μ M の VKO 濃度で良好な回帰を示

した (Fig. 2-8 A)。しかし、抵抗性群は感受性群より低い VKOR 活性を示し、100 μM でプラトーに達した (Fig. 2-8 B)。100 μM 以上の高濃度では抵抗性群は直線性に VKO の還元反応を示した。これはおそらく他の還元酵素による非特異的な還元反応だと考えられる (Fig. 2-8 C)。そこで、抵抗性群では VKOR 活性のミカエリス・メンテン式への非線形回帰の最大濃度として 100 μM を使用した。Table. 2-5 に、この式で計算された V_{max} 、 K_m 、 V_{max}/K_m を示した。二群間で K_m 値に有意差はなかったが、感受性群は抵抗性群と比較して 13.5 倍有意に高い V_{max} と 16.5 倍高い V_{max}/K_m 値を示した。

ワルファリンによる VKOR 活性阻害試験

ワルファリンに対する各 VKOR の感受性を評価するために、阻害試験を実施した。Fig. 2-9 はワルファリン非添加時の VKOR 活性で補正した阻害曲線である。阻害曲線から計算された IC_{50} 値は Table 2-5 に示されている。感受性群は、阻害剤の濃度が 0.01 ~ 5 μM の範囲で阻害曲線への非線形回帰を示した。一方、抵抗性群は 0.1 ~ 100 μM と、より高い濃度範囲でフィッティングし、感受性群と比較し 37.5 倍の IC_{50} 値を示した。

VKOR のイムノブロッティング

肝ミクロソーム画分を用いたウェスタンブロット法を実施して、肝臓に於ける VKORC1 タンパク質発現量を、リボソームタンパク質 S6 (RPS6) をコントロールとし半定量した。Fig. 2-10 はウェスタンブロットで得られた各バンドと各群の平均発現量を示している。感受性群と抵抗性群の間で VKORC1 タンパク質濃度に有意差はなく、また、感受性群と抵抗性群の間で VKORC1 または PRS6 発現量にも有意差は認められなかった。

VKOR と低分子リガンドのドッキングシミュレーション

ドッキングシミュレーションによりワルファリン・VKO と各 VKOR の結合性を評価した。抵抗性群及び感受性群 VKOR のホモロジーモデル (それぞれ R-VKOR、S-VKOR) は、モデル 1 (Cys43-Cys51、Cys132-Cys135) 及びモデル 2 (Cys51-Cys132) の両方を構築した。Fig. 2-11 ではワルファリンとモデル 1、VKO とモデル 2 がドッキングされた複合体の立体構造を示している。Glide ドッキングスコアおよび eModel スコアを Table 2-6 に示した。ドッキングスコアでは ≤ -7.0 kcal/mol を、eModel スコアでは ≤ -50 kcal/mol を良好な予測モデルとしての閾値として用いられる [62]。全ての組み合わせでこれらの閾値を超える値が得られた。一方、R-VKOR はモデル 1 と 2 の両方で、S-VKOR と比較しワルファリンとのドッキングスコアは低い傾向にあった。しかしながら、VKO とのドッキングシミュレーションでは、R-VKOR は S-VKOR と

ほぼ同じ（モデル1）またはそれ以上（モデル2）のドッキングスコアを示した。

分子動力学シミュレーション

各 VKOR とリガンドの結合性をより詳細に解析するために上記のドッキングシミュレーションで得られた複合体を用い分子動力学 (MD) シミュレーションを行った。Fig. 2-12、13 は、ワルファリン或いは VKO と各 VKOR のアミノ酸残基（ワルファリンと VKOR モデル 1、VKO と VKOR モデル 2）の間で確認された動的な相互作用を示している。S-VKOR はワルファリンに対して高い親和性を示した（それぞれワルファリンとの疎水性および極性相互作用が青線および緑線として示されている）。一方、R-VKOR 中のワルファリンは全体的に溶媒に曝され、相互作用が弱い事が示唆された (Fig. 2-12)。一方、VKO とのシミュレーションでは S-VKOR 及び R-VKOR の両方が強い疎水性相互作用を示した (Fig. 2-13)。ただし、VKO の還元を担う Cys135 は、S-VKOR と比較して R-VKOR では比較的低い相互作用を示した。

VKOR へのワルファリン結合の重要な残基である Phe55 との結合率は、S-VKOR (30%) と比較して、R-VKOR では 6% と低い値を示した (Fig. 2-12)。これらの値は、MD シミュレーション中に各相互作用がどの程度発生するかを表した割合である。また、Phe55 の芳香環とワルファリンの距離を計測した所 (Fig. 2-14)、S-VKOR が R-VKOR (5-7Å) より近い (4-5Å) 事を発見した。各 VKOR 残基のタンパク質構造内の柔軟性の指標としての二乗平均平方根変動 (RMSF) を Fig. 2-15 に示した。

考察

VKOR の活性測定法について

VKOR の種内/種間差は抗凝血系化合物に対する感受性決定のための重要な要素である。例えば、鳥類は齧歯類と比較して異なる IC_{50} 値を示す他、ヒトの临床上は VKOR の一塩基多型が血栓症へのワルファリン治療の投与量に影響を与える事が知られている [64]。このように、比較薬理学および毒性学の観点から VKOR の正確な分析が求められている。本研究では新規ジスルフィド還元剤である THP を DTT の代替として使用したが、DTT とほぼ同じ V_{max}/K_m 及び IC_{50} 値が得られた (Table 2-4)。 V_{max}/K_m は生理学的酵素効率の指標として用いられ、 IC_{50} は阻害剤の効力の指標として用いられる。この結果から THP は VKO の直接的な減少を低下させるが、酵素効率、殺鼠剤感受性の推定に於いて 2 つの還元剤の間に大きな違いは無いと考えられる。

Fregin らは VKOR とヒト第 IX 因子を強制発現した HEK293 細胞を用いた阻害試験を確立し、これが DTT と比べ *in vivo* の感受性と相関のある値を示したと報告した [41]。本細胞アッセイの利点としては、DTT 等を添加せず、細胞内の生理的な還元剤

を使用している点が挙げられる。細胞アッセイと本研究で得られた IC_{50} 値を比較すると、細胞アッセイの IC_{50} は 24.7 nM だったが、本研究では 162 nM (DTT) および 189 nM (THP) だった。興味深い事に、Rost らによる古典的な DTT アッセイでは、本研究より大幅に高い 3034.8 nM を示した [21]。この違いは実験手技の違いに由る可能性がある。本研究では非特異的な還元反応を抑えるために 1 mM の DTT を使用したが、Rost らは 5 mM の DTT を反応に用いた。また、本研究では肝ミクロソームを用いたが、Rost らは VKOR を発現した組換え HEK 293 細胞破碎液を使用していた。また、細胞アッセイは IC_{50} の計算に適している反面、VKOR の自然な発現量を反映できないうえ、酵素速度論的解析ができないという点で制約もある。従って、THP と肝ミクロソームを使用した *in vitro* アッセイも VKOR の解析には依然として必要である。THP アッセイの信頼性を評価するには、より多数の VKOR 変異体を使用し、これらのアッセイ系と更なる比較を行う事が求められる。

本研究で得られた THP と DTT の違いの 1 つは、THP を用いた際の V_{max} が大幅に低い事である。予備試験に於いてインキュベーション時間と VKOR 活性の直線性を確認している事から、反応の飽和が原因ではないと考えられる。DTT で得られた高 V_{max} の理由として考えられるのは、DTT が VKOR の 2 つのジスルフィド結合を介した電子のパスウェイを超えて、VKO に近い 2 番目のジスルフィド結合 (Cys132-Cys135) を直接還元する可能性がある事が挙げられる。この 2 番目のジスルフィド結合は脂質二重膜中に存在するが、DTT はクロロホルムやジエチルエーテルなど低極性溶媒にも可溶であるため、二重膜中の本ジスルフィド結合にもアクセスできると予想される。THP は比較的近年発見された化合物であるため脂溶性についての知見は乏しいが、3 つの炭素鎖の末端それぞれにヒドロキシ基が存在し高い水溶性を有する化合物であるため、DTT と比較し脂溶性が低い可能性がある。この THP での低 V_{max} が脂質二重膜中の 2 番目のジスルフィド結合へのアクセスの可否に起因しているとする、DTT と比較しより生理的な条件を反映した還元剤であると言う事ができる。この点について、最初のジスルフィド結合を欠く組換え VKOR を使用して DTT と THP の活性を比較し検討する事が必要である。また、より正確な解析を行うには VKOR の生理学的還元剤の同定も求められる。

Leu76Pro 変異のワルファリン抵抗性への影響

本研究では、ミクロソーム画分による *in vitro* 酵素速度論的解析と *in silico* ケモインフォマティクスのモデリングにより Leu76Pro がワルファリン感受性にどのような影響を与えるかを精査した。Leu76Pro 変異を有す抵抗性群は感受性群と比較してワルファリンに対する IC_{50} 値が約 37.5 倍高かった (Fig. 2-9、Table 2-5)。現状世界各地

で顕著な抵抗性を示す事が報告されている結合部位である 139 位の変異では感受性群より約 40 倍高い IC_{50} (フランスの Thy139Phe 変異) を示した。ヒトで報告されている抵抗性型 VKOR では 2.5~50 倍高い IC_{50} 値を示している。本 Leu76Pro 変異は結合ポケットから離れた ER ループ領域にあるものの、これらと比肩する抵抗性を有していると言える。

ドッキングシミュレーションでは、R-VKOR はモデル 1 と 2 の両方でワルファリンに対する結合性 (ドッキングスコア) が低いと予測され、*in vitro* で観察された高い IC_{50} 値と一致した結果となった (Table 2-6)。MD シミュレーションでは、S-VKOR はワルファリンとの高い疎水性およびイオン相互作用を示したのに対して R-VKOR ではモデル 1 に於いてワルファリンが全体的に溶媒に曝され結合ポケットとの親和性が低い事が示唆された (Fig. 2-12)。この要因として、最も重要な結合サイトとされる Phe55 との親和性の低下が原因である可能性がある。S-VKOR ではワルファリンと Phe55 は 27%の相互作用を示したが、R-VKOR ではわずか 6%だった。また、ワルファリンと Lys30 との相互作用は、S-VKOR では 90%だったが、R-VKOR では比較的 46%だった。そこで、Phe55 とワルファリンの間の距離を測定すると、S-VKOR の方が R-VKOR よりも相対的に短い距離を示した (S-VKOR で 4~5Å、R-VKOR で 5~7Å、Fig. 2-14)。また、タンパク質構造の可塑性の指標である RMSF も測定した所、R-VKOR のループ構造の RMSF は、S-VKOR の値よりも低い値を示した (Fig. 2-15)。これは R-VKOR では ER ループ構造の可動性が低い事を示唆しており、結果として ER ループ上の Phe55 がワルファリンと結合し辛いという可能性がある。このように、ER ループ構造上の変異もワルファリンへの感受性に大きな影響を与える可能性があるが、一般にホモロジーモデル構築時にはヘリックス構造よりもループ構造では予測精度が低くなる傾向にある。より正確な理解には哺乳類 VKOR の立体構造の実験的な解明が望まれる。

Leu76Pro 変異の VKOR 活性への影響

抵抗性群は、*in vitro* THP アッセイで著しく低い VKOR 活性 (V_{max} 、 V_{max}/K_m) を示した (Fig. 2-8、Table 2-5)。 V_{max}/K_m は生理的基質濃度での活性の指標である事から、抵抗性群は生理的な基質濃度に於いても VKOR 活性が低い事が示唆された。一方、VKO とのドッキングシミュレーションでは、抵抗性群はモデル 1 では感受性群とほぼ同じドッキングスコアを、モデル 2 では感受性群よりも高いドッキングスコアを示した (Table 2-6)。また、MD シミュレーションでも、感受性群・抵抗性群共に VKO 全体を覆う疎水性相互作用を示し、ほぼ同じ親和性を持つ事が示唆された (Fig. 2-13)。これらは一見すると相反する結果に見えるが、*in vitro* 試験に於いても酵素と基質の

間の親和性の指標となる K_m 値に有意差がなかった (Table 2-5) 事を考慮すると、二群間で VKO と VKOR の結合力自体には差はないという事ができる。つまり、抵抗性群での低 VKOR 活性の原因は VKO との結合性の低下ではなく、VKOR の機能面の変化である可能性がある。MD シミュレーションで活性残基である Cys135 のシステインと VKO 間の親和性を予測すると、S-VKOR の Cys135 は、シミュレーション時間の 63% で相互作用が発生していたが、抵抗性群の相互作用は比較的 low 49% だった。これが低活性の一因である可能性がある。また、MD シミュレーションでタンパク質の可動性の指標となる RMSF 値を解析すると、ER ループ中の活性を担う Cys43 付近の RMSF は R-VKOR の方が低かった (Fig. 2-15)。つまり、抵抗性群では Cys43 周辺の構造の可動性が低い事が示唆される。この Cys43 の可動性の低さは、VKOR の還元反応中に生じるモデル 1 (Cys43-Cys51 と Cys-132-Cys135 の結合) からモデル 2 (Cys51-Cys135) への立体構造の変換を阻害する可能性があり、抵抗性群での低 VKOR 活性の原因と成り得る。

また、76 位近傍の変異としてヒトでは 71 位と 77 位での変異が報告されている。Hodroge らはこれらの変異 VKOR の活性は、DTT を用いたアッセイで検出するには低すぎると報告した。一方、これらの変異体を上記の細胞アッセイで測定すると、第 IX 因子の産生活性は野生型とほぼ同じだった [51,65]。これら 2 つの知見のどちらが生理的な VKOR 活性を示しているか、また、この違いの原因は不透明である。1 つの可能性として、*in vitro* 試験では VKOR 活性を 10 分間という短時間で測定しているのに対し、細胞アッセイでは 72 時間の培養後の分泌された第 IX 因子の活性を観察しているという違いが挙げられる。つまり、細胞アッセイでの VKOR 活性が低かったとしても 72 時間という長時間のインキュベーション中での第 IX 分泌には十分であり見かけ上野生型と同じ第 IX 産生活性を示しているという可能性がある。本研究では THP を DTT の代替となる還元剤として *in vitro* の VKOR 酵素速度論的解析を行った。DTT と比較し還元剤によるより低い直接還元が達成され (data not shown)、HPLC-APCI-MS/MS による定量で従来の HPLC-UV 検出系 (LOQ: 37.8 nM) では不可能だった IC_{50} 値を高感度で測定する事に成功した。今後、本手法と細胞ベースのアッセイの両方を併用した VKOR の更なる解析は、VKOR の全体像を明らかにするのに役立つと期待される。

今回の VKOR 活性試験ではドブネズミ (SD rat) とクマネズミ (S-rat) の間でも異なる VKOR 活性を示し、S-rat の方が 40 倍も低い V_{max}/K_m 値を示した (Table 2-4、2-5)。これらの VKOR のアミノ酸配列を比較すると、90 位のアミノ酸がドブネズミではイソロイシン、クマネズミではロイシンと異なる事が一因である可能性がある。実際にクマネズミとドブネズミはワルファリンに対して生体レベルでも感受性が異なる

り、実験的にはドブネズミはワルファリン 0.005%含有餌の 3 日程度の摂取で致死するが、クマネズミでは 0.025%の毒餌の摂取が必要であった [9]。このため、ドブネズミはクマネズミと比較し血液凝固因子産生に VKOR の寄与率が高い可能性がある。ドブネズミとクマネズミのビタミン K サイクル、血液凝固系の種差を精査する事で現在も未知な点が多いビタミン K 代謝の解明に寄与する事ができると考えられる。

小括

本研究により東京の抵抗性ラットが保有していた VKOR の Leu76Pro 変異は結合ポケットから離れた位置にあるにも拘らずワルファリンに対し顕著な抵抗性を生じさせる他、VKOR の VKO 還元活性も低下させる事が判明した。また、そのメカニズムとして本変異がワルファリンへの最も強力な結合サイトとされる ER ループ上の Phe55 とワルファリンとの親和性の低下、ER ループ部位の可動性の低下させている可能性が示唆された。

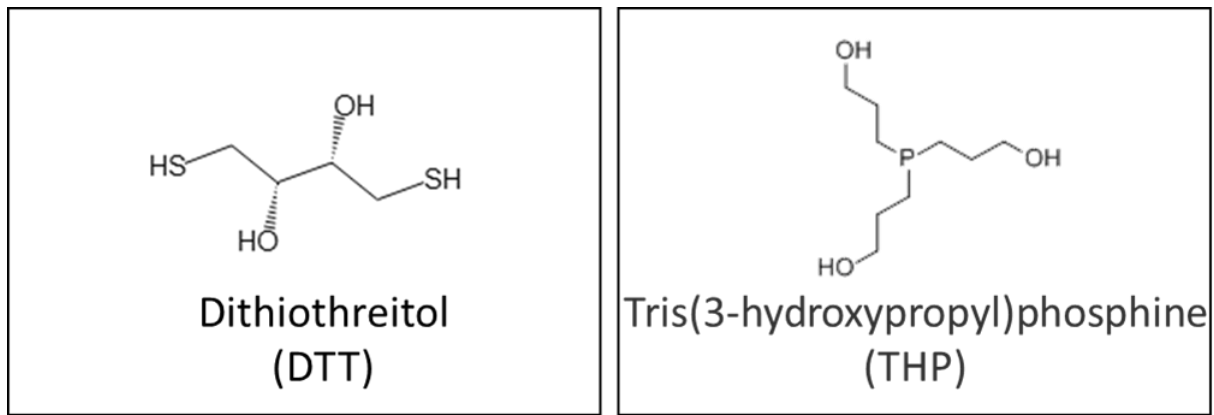


Fig. 2-1 : ジスルフィド結合選択的還元剤の構造式。本研究で用いた選択的ジスルフィド結合還元剤、ジチオスレイトール (DTT) と Tris(3-hydroxypropyl)phosphine : THP の構造式。

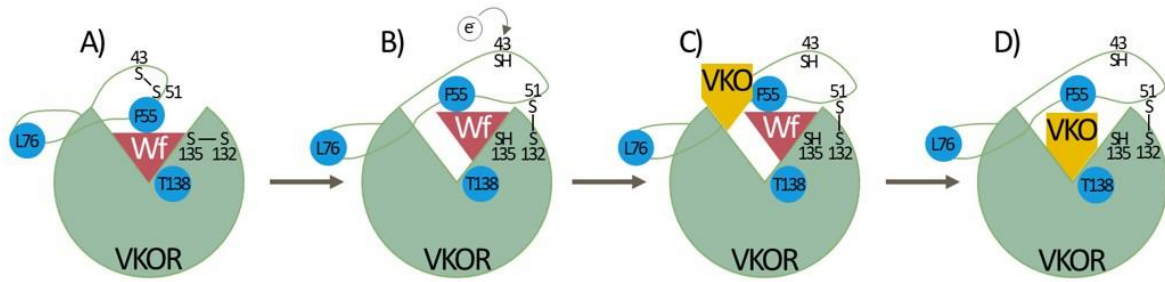


Fig. 2-2 : VKOR の反応概略図。Czogalla らにより提唱された VKOR の反応スキーム [65]。

A) ワルファリンは VKOR モデル 1 (Cys43-Cys51、Cys132-Cys135) の疎水性結合ポケットに結合する。55 位フェニルアラニン 55 (F55) 及び 138 位スレオニン 138 (T138) が、主要なワルファリン結合サイトだと考えられている。

B) レドックスパートナーにより Cys43 の SH 基が還元される事で VKOR がモデル 2 (Cys51-Cys132) に変形する。この際 55F に引っ張られる事でワルファリンの結合ポケットとの結合性が減弱する可能性がある。

C) 生理的基質であるビタミン K エポキシド (VKO) はモデル 2 の結合ポケット中のワルファリンと VKOR の結合で競合する。

D) VKO がモデル 2 の疎水性ポケットに結合し、Cys135 の SH 残基が VKO を還元する。その後 VKOR はモデル 1 へ変形する。

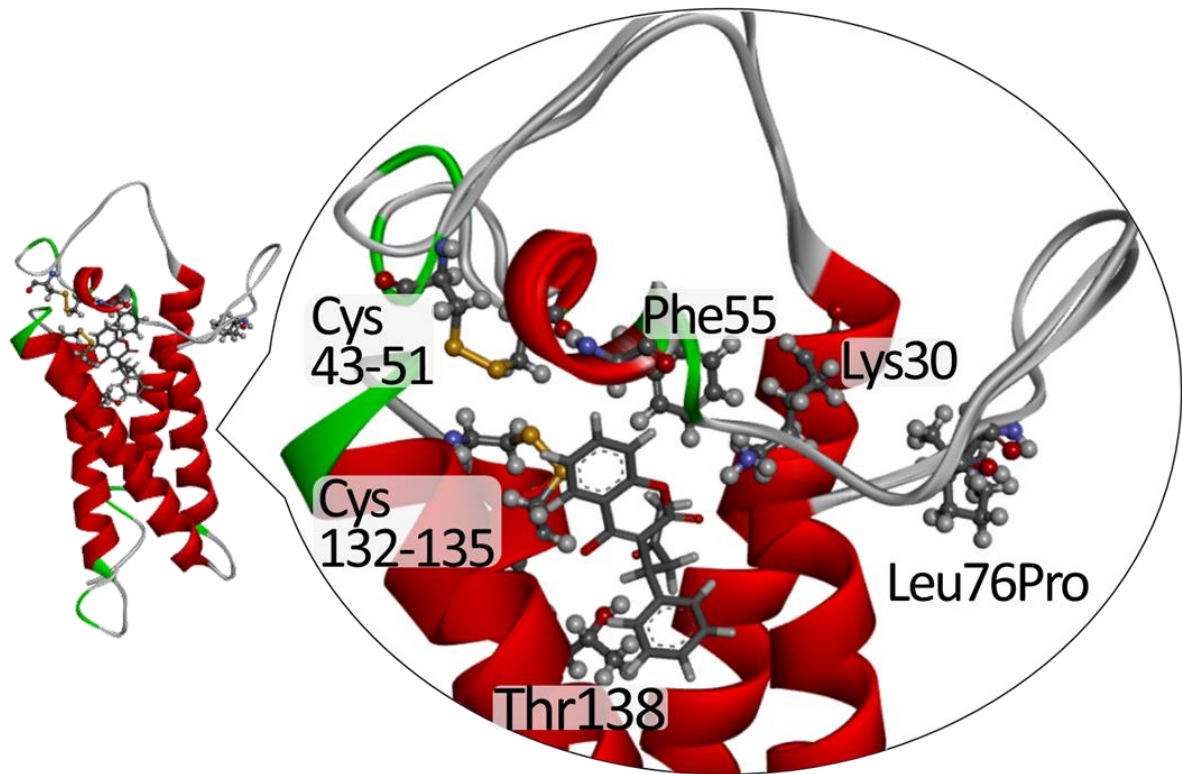


Fig.2-3：ラット VKOR モデル 1 (Cys43-Cys51、Cys132-Cys135) 立体構造。本ホモロジーモデルは BIODIA Discovery Studio により作成した。主要な結合サイト、活性中心、変異部位のアミノ酸をボール&スティック図、結合ポケット中のワルファリンをスティック図で表し、それ以外は 3D リボン図で示している。

Table 2-1 : 世界各地の抵抗性齧歯類が保有する VKOR 変異

Site	Wild type	Mutant	Country	Reference
33	Arg	Pro	Japan	24
35	Arg	Pro	Japan	24
41	Ala	Thr	Japan	24
41	Ala	Val	Japan	24
58	Arg	Gly	China	27
59	Trp	Arg	Argentina	50
61	Arg	Trp	Japan	27
76	Leu	Pro	Japan	27, this study
120	Leu	Gln	France, UK	50
128	Tyr	Phe	France, UK	50
139	Tyr	Phe	Belgium, France, Korea	50
139	Tyr	Cys	China, Denmark, France, Germany, Hungary, UK	50
139	Tyr	Ser	UK	50

これまでに報告された抵抗性齧歯類が保有している VKOR 変異 [24,27,50]。

Table 2-2: ラット *Vkorc1* 遺伝子配列解析に用いたプライマー配列

Primer	Sequence
RatVKORC1_Forward	TAAGGCAAAGCAAGTCATGTCAGCCTGG
RatVKORC1_Reverse	GTGTCTGCGCTGTACTGTCGACATC
RatVKORC1_exon1	TCTATTCTGCGGACACTG
RatVKORC1_exon2	AAGTGTTCTCCTTGTGAGGA
RatVKORC1_exon3	CCTGTCATTGGGGAGGTGTT

本研究で用いた抵抗性群、感受性群クマネズミの *Vkorc1* のコーディング領域(CDS)をゲノム DNA から解読する際に用いたプライマーセット。CDS 全長のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を RatVKORC1_Forward と RatVKORC1_Reverse の 2 つのプライマーを用いて行った後に、3 つのエキソン領域を RatVKORC1_exon1~3 の各プライマーで解読した。

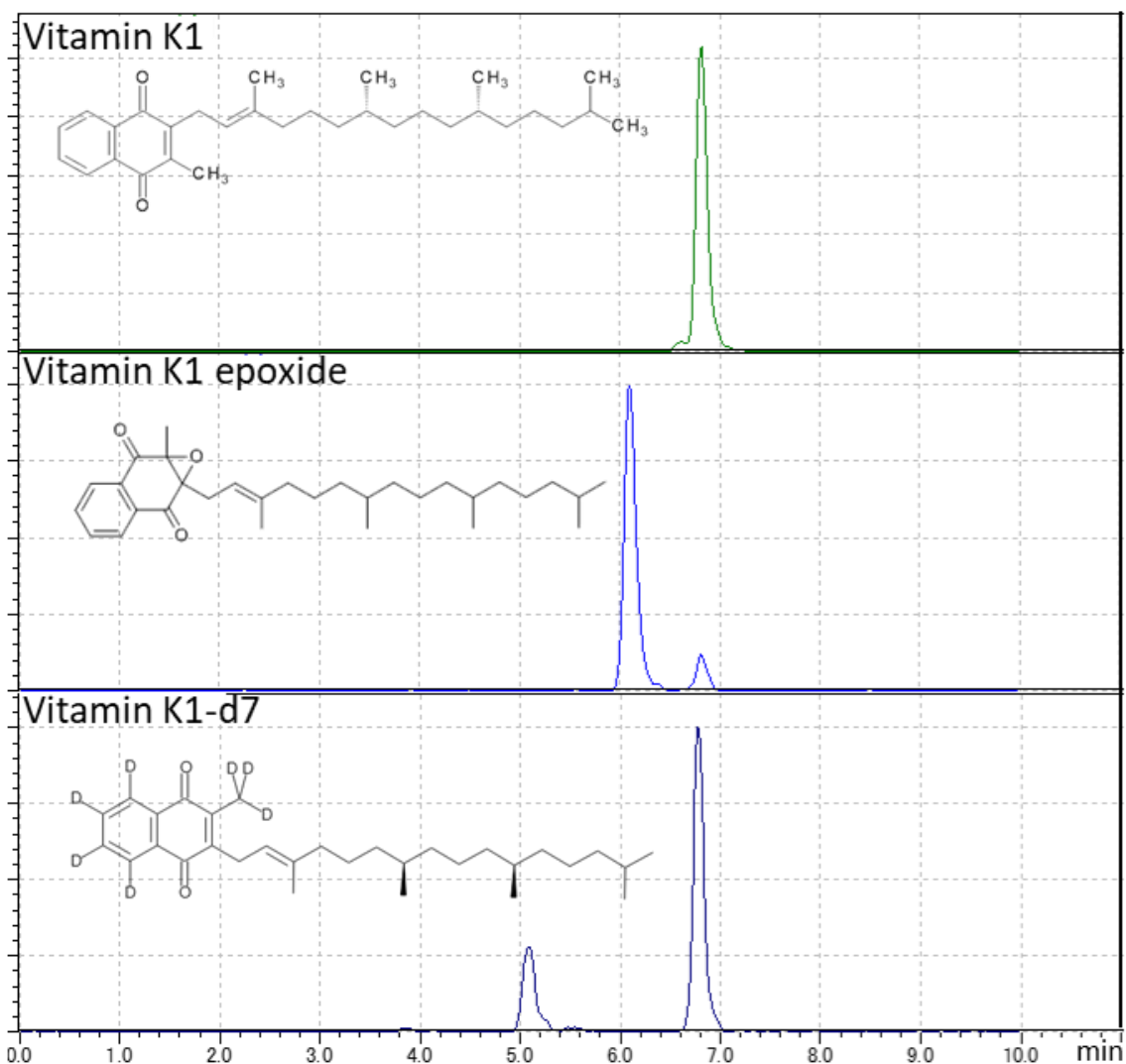


Fig. 2-4: ビタミン K 類クロマトグラフ。VKOR の反応生成物であるビタミン K1 と、液液分配の内部標準物質としてビタミン K1 の重水素標識体 (d7 体)、また、VKOR の基質であるビタミン K1 エポキシドを、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離の後、大気圧化学イオン化法 (APCI) 質量分析計 (MS/MS) で定量した。これらの APCI-MS/MS 分析条件とその分析精度は Table 2-3 に示した。

Table 2-3 ビタミン K 類の HPLC-APCI-MS/MS 分析条件、分析精度

	Recovery rate (%)	LOD (nM)	LOQ (nM)	Ionization mode	Precursor product (m/z)	Product (m/z)	Dwell time (ms)	Q1 bias (V)	pre CE (V)	Q3 bias (V)	pre (V)
Vitamin K1	83.89±1.62	1.40nM	4.24nM	-	450.2	185.0	100.0	12.0	35.0	18.0	
Vitamin K1 epoxide	77.89±1.49	5.21nM	15.8nM	-	465.2	210.25	100.0	13.0	31.0	20.0	
Vitamin K1 d7	83.49±1.64	3.04nM	9.21nM	-	456.2	245.0	100.0	12.0	34.0	24.0	

高速液体クロマトグラフィー大気圧化学イオン化法質量分析計（HPLC-APCI-MS/MS）で検出・定量したビタミン K 類の分析条件と分析精度を示した。分析精度の指標として液液分配後の各回収率と検出限界（LOD）と定量下限（LOQ）を肝ミクロソーム画分に各化合物の分析標準品を添加しての添加回収試験を行い算出した。

Table 2-4 : VKOR 酵素速度論的パラメーター

	DTT	THP
V_{max} (pmol/min/mg protein)	195.2 ± 18.1*	58.1 ± 5.5
K_m (μM)	17.0 ± 7.0*	5.6 ± 3.2
V_{max}/K_m (mL/min/mg protein)	11.5 ± 4.4	10.3 ± 2.9
IC_{50} (μM)	0.162 ± 0.027	0.189 ± 0.028

DTT、THP それぞれを用いた際の VKOR 活性の酵素速度論的パラメーターを示している。VKOR 活性の測定は SD ラット肝ミクロソーム画分を用いた。 V_{max} : 最大反応速度、 K_m : 反応速度が $V_{max}/2$ になる際の基質 (VKO) 濃度 (ミカエリス定数)、 V_{max}/K_m : 酵素効率、 IC_{50} : VKOR 活性が 50% になる際の阻害剤 (ワルファリン) 濃度。各値は平均 ± 標準誤差 (SEM) で示し、* は二群間で有意差がある事を示す (n=4, Student's *t*-test, $p < 0.05$)。

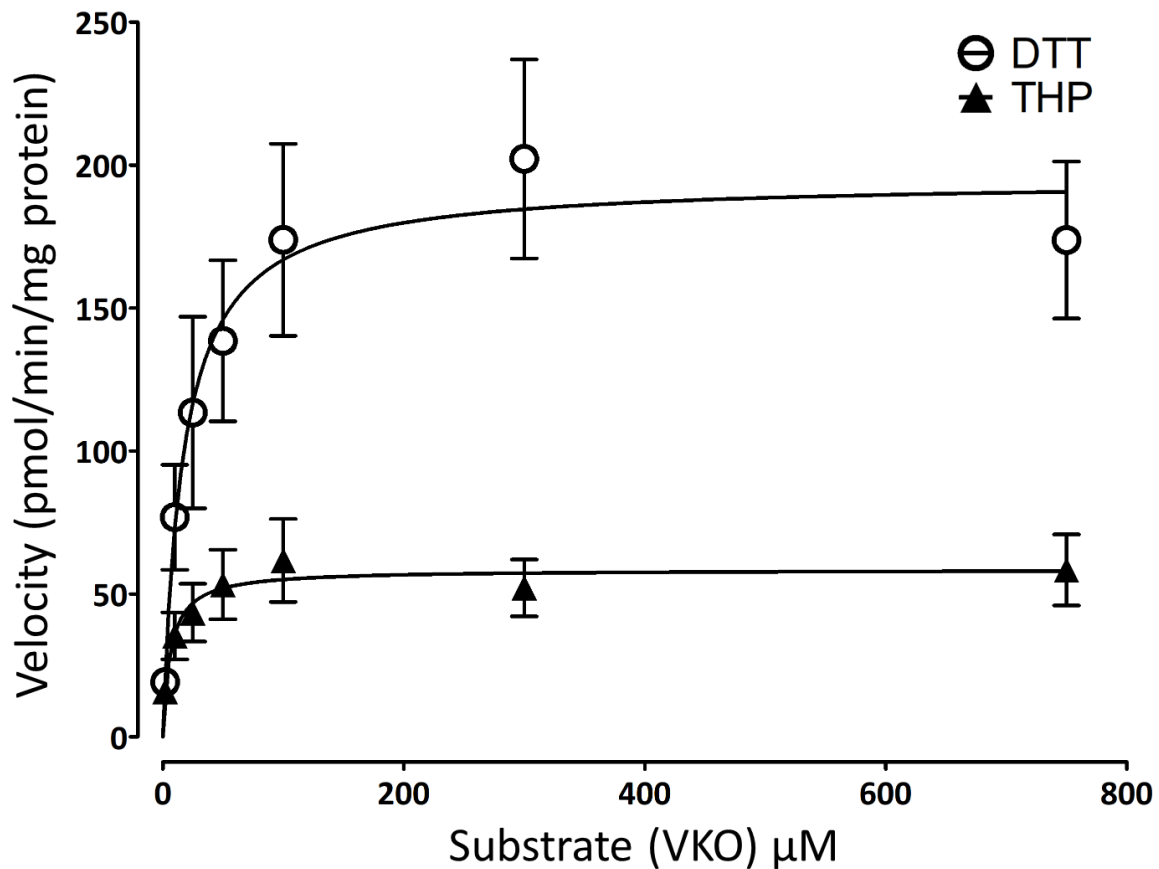


Fig. 2-5 : VKOR 活性のミカエリス・メンテンプロット。DTT (○)、THP (▲) を用いて測定した VKOR 活性の値を GraphPad Prism 5 でミカエリスメンテン式に非線形回帰的にフィッティングさせた。X 軸は基質である VKO 濃度、Y 軸は VKOR による VKO の VK への還元速度を示している。本回帰曲線から計算された酵素速度論的パラメーターは Table 2-4 に示されている。各プロットは平均 \pm 標準誤差 (SEM) で示している (各 $n=4$)。

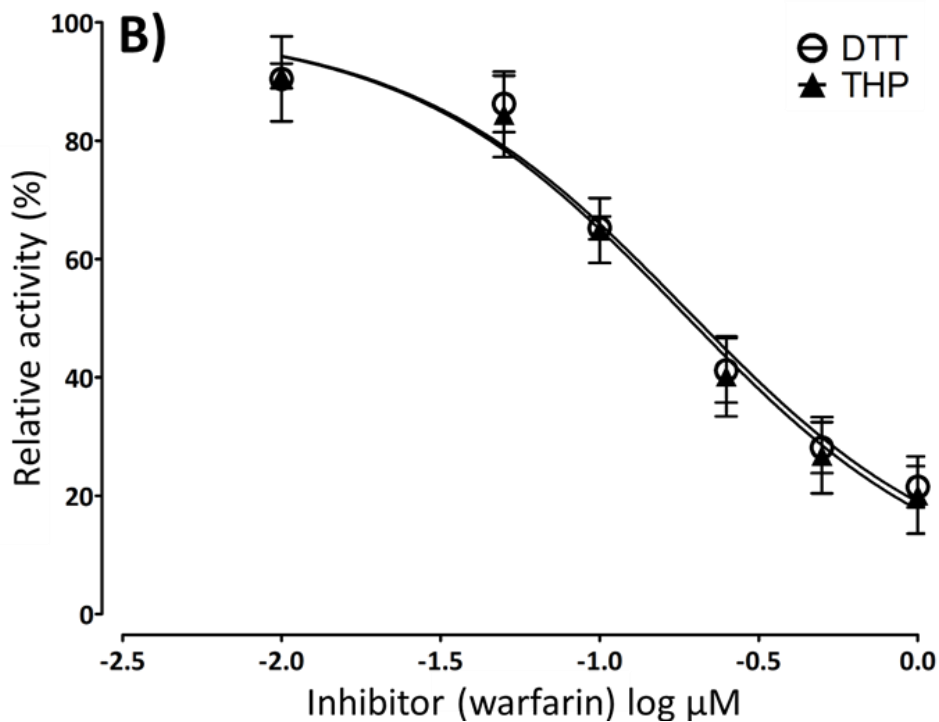
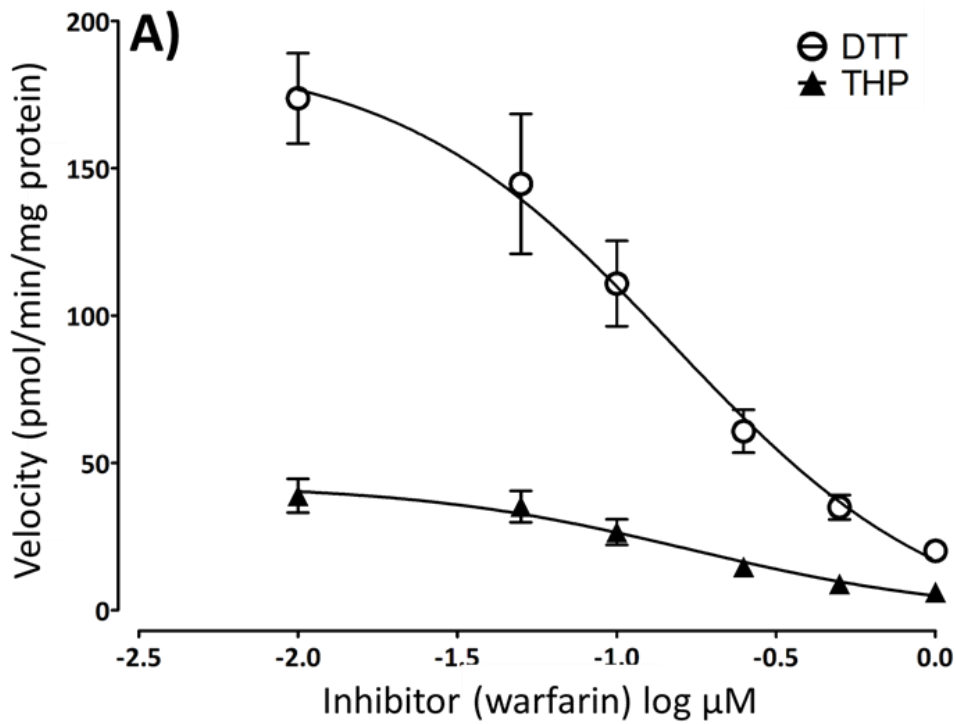


Fig. 2-6 : VKOR 活性のワルファリンによる阻害曲線。50 μM の基質 (VKO) に対し 0.01 ~ 1 μM のワルファリンナトリウムを添加し阻害試験を行い、阻害曲線に非線形回帰した。本回帰曲線から計算された 50%阻害 (IC_{50}) 値は Table 2-4 に示されている。各プロットは平均 \pm 標準誤差 (SEM) で示している ($n=4$)。A) 縦軸に VKOR 活性を取ったグラフ。B) 縦軸を各群のワルファリン非添加時の活性を 100%とした際の相対値で示したグラフ。

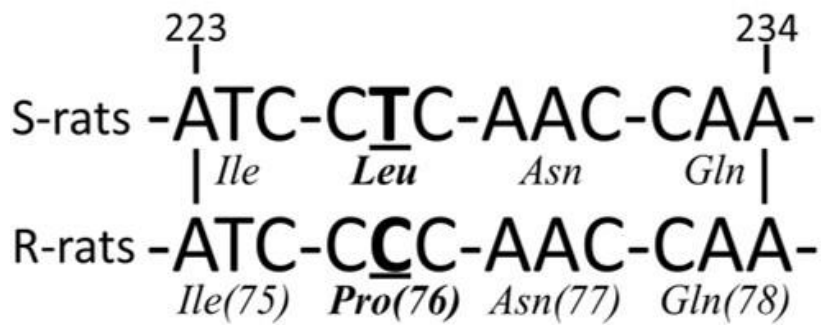


Fig. 2-7 : Vkorc1 遺伝子の変異前後の配列。ワルファリン感受性群 (S-rats) 及び抵抗性群 (R-rats) に於ける VKORC1 遺伝子の変異 (Leu76Pro) 前後のアライメント。抵抗性群では 227 位のチロシンがシトシンへ変異しており、これにより 76 位でロイシンからプロリンへのミスセンス変異が生じている。本変異は第 2 章から第 4 章で用いた全ての抵抗性群で確認された。

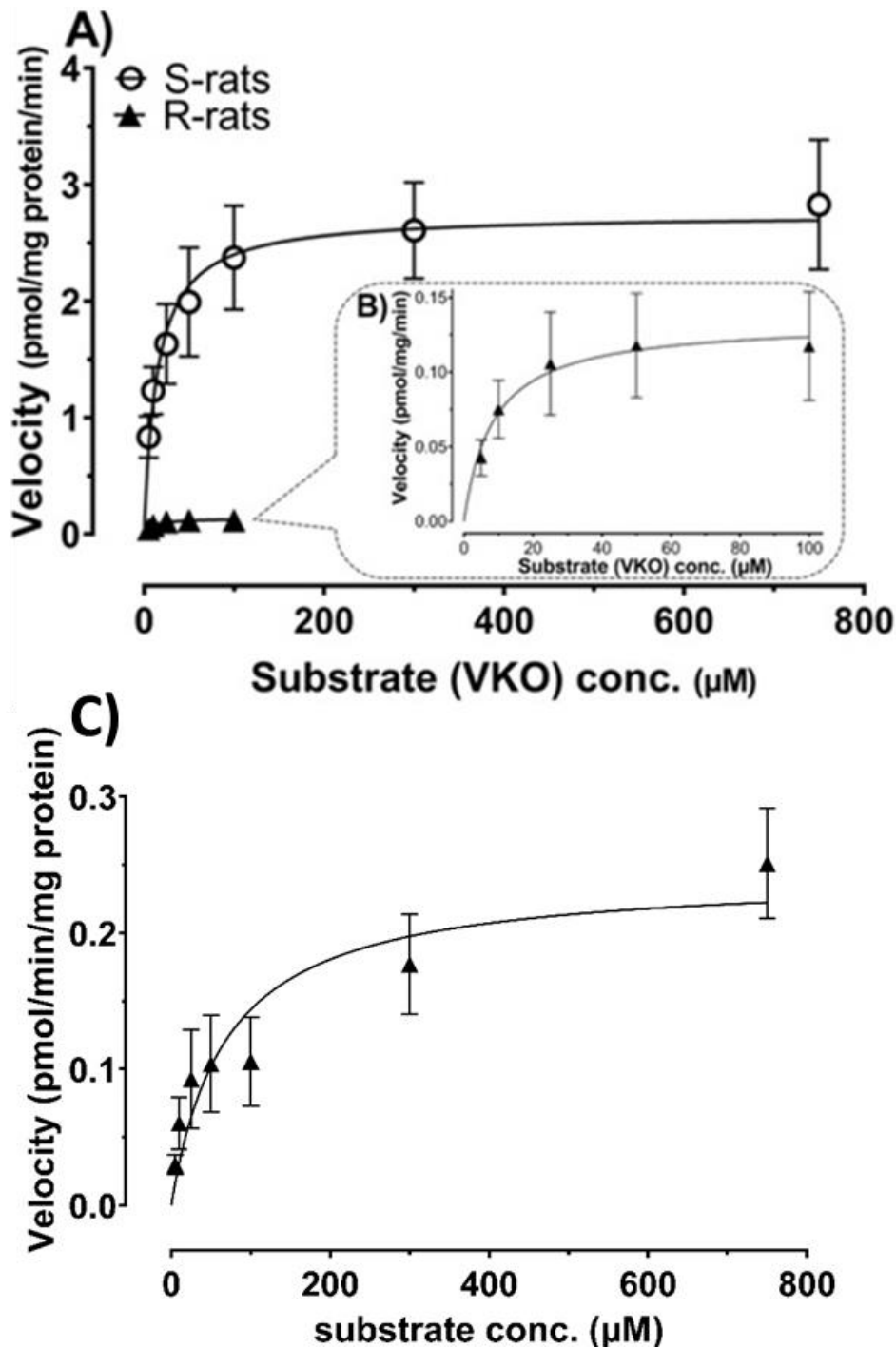


Fig. 2-8 : 抵抗性群・感受性群でのミカエリス・メンテンプロット。VKOR 活性は THP を還元剤として用いて測定した (各 $n=4$ 、平均 \pm 標準誤差)。○ : 感受性群 (S-rats)、▲ : 抵抗性群 (R-rats)。A) 感受性群と抵抗性群の比較、B) 抵抗性群の拡大図、C) 抵抗性群の VKO 750 μM までのミカエリス・メンテンプロット。抵抗性群では VKO 濃度 100 μM までは典型的な非線形回帰を示したのに対し 100 μM 以上では直線性に上昇する 2 層性の動態を示した。このため、抵抗性群では酵素速度論的解析は 100 μM を最大値とした。本回帰曲線から計算されたパラメーターは Table 2-5 に示した。

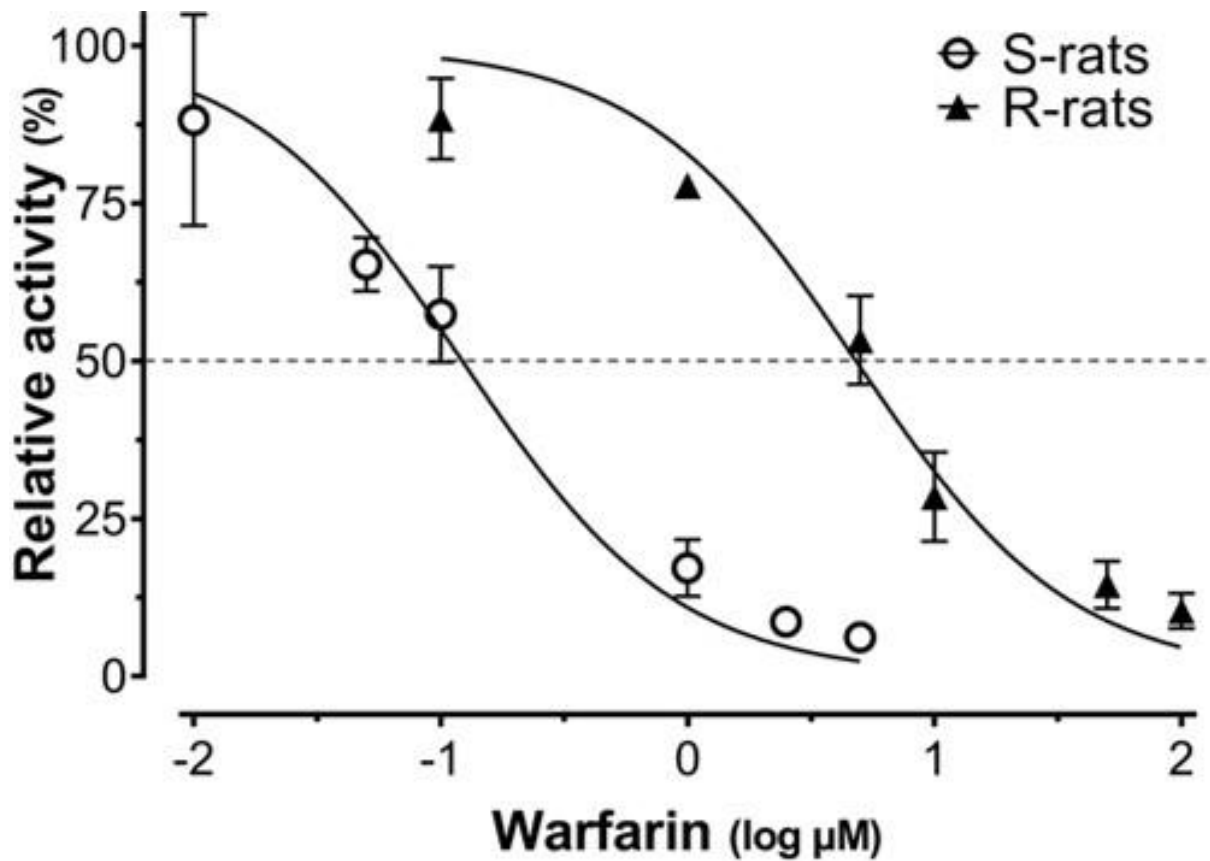


Fig. 2-9：抵抗性群・感受性群でのワルファリンによるVKOR活性の阻害曲線。各プロットは平均値±標準誤差 (SEM) で示している (各 n=4)。○：感受性群 (S-rats)、▲：抵抗性群 (R-rats)。はワルファリン非添加時の活性を 100%とした相対値で示している。50 μM の基質 (VKO) に対し感受性群では 0.01 ~ 5 μM 、抵抗性群では 0.1 ~ 100 μM のワルファリンナトリウムを添加し阻害試験を行った。各活性値は阻害曲線に非線形回帰し 50%阻害 (IC_{50}) 値を算出した (Table 2-5)。

Table 2-5 : 抵抗性群・感受性群の VKOR 酵素速度論的パラメーター

	S-rats	R-rats
V_{max} (pmol/mg protein /min)	2.57 ± 0.55	0.19 ± 0.06*
K_m (μM)	12.1 ± 1.9	11.9 ± 2.9
V_{max}/K_m	0.231 ± 0.056	0.014 ± 0.003*
IC_{50} (μM)	0.140 ± 0.046	5.250 ± 0.799*
Log IC_{50} (μM)	-0.966 ± 0.137	0.692 ± 0.074*

THP を用いて測定した感受性群 (S-rats) と抵抗性群 (R-rats) の VKOR 活性酵素速度論的パラメーターを示している。 V_{max} : 最大反応速度、 K_m : 反応速度が $V_{max}/2$ になる際の基質 (VKO) 濃度 (ミカエリス定数)、 V_{max}/K_m : 酵素効率、 IC_{50} : VKOR 活性が 50% になる際の阻害剤 (ワルファリン) 濃度。各値は平均 ± 標準誤差 (SEM) で示し、* は二群間で有意差がある事を示す (n = 4, Student's *t*-test, $p < 0.05$)。

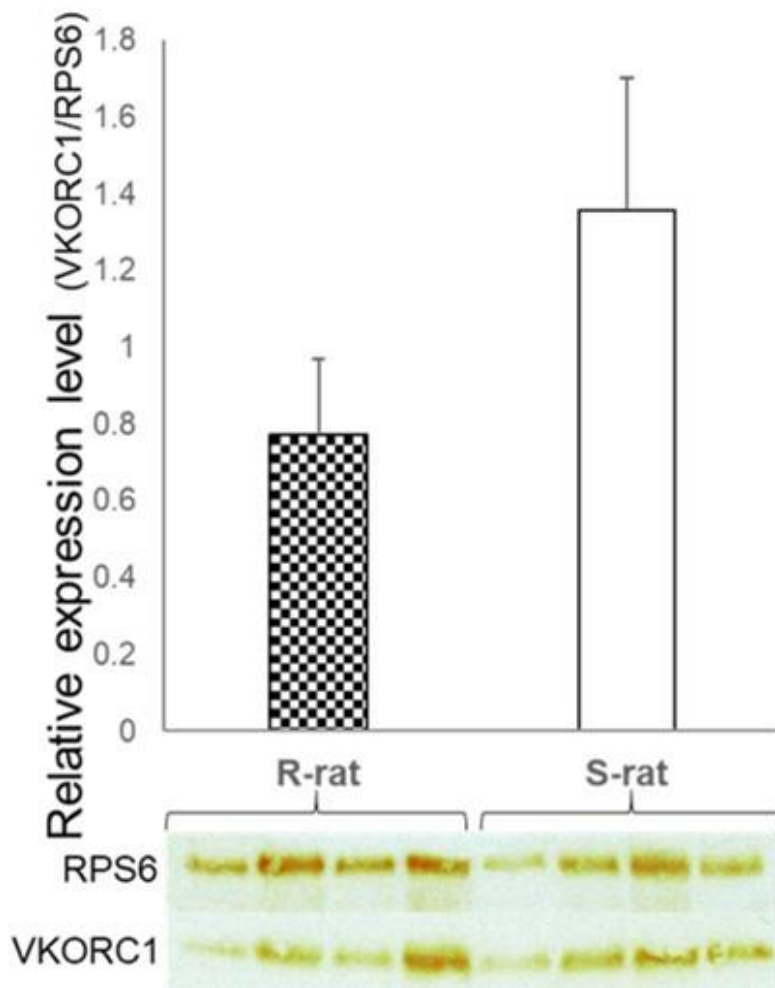
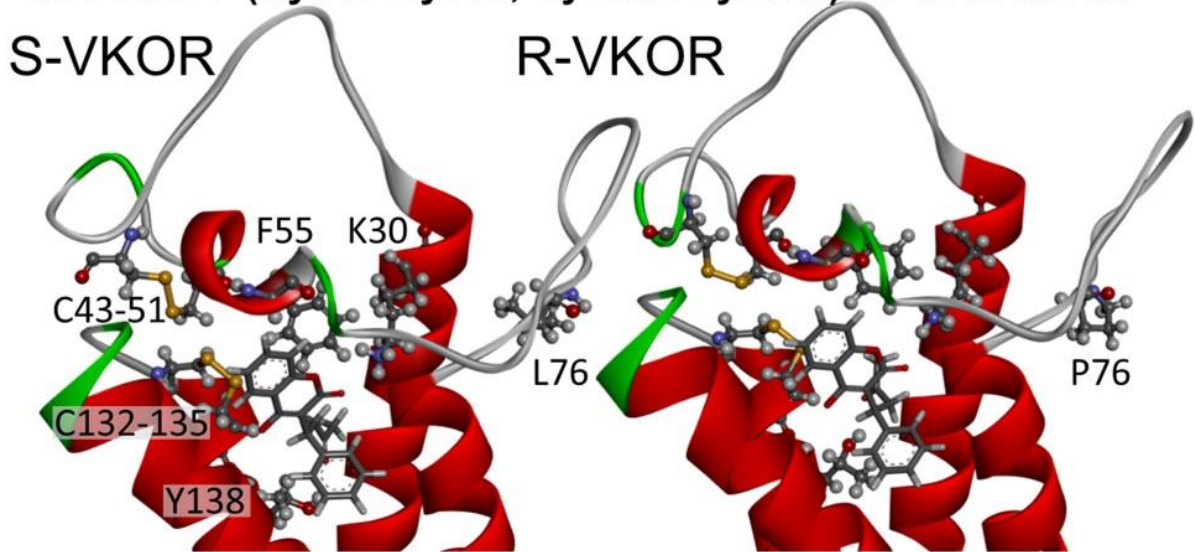


Fig. 2-10: VKORC1 のイムノブロッティング。肝ミクロソーム画分を使用したウエスタンブロット法により感受性群 (S-rats) と抵抗性群 (R-rats) の VKORC1 タンパク質発現量を半定量した。ローディングコントロールとしてリボソームタンパク質 S6 (RPS6) を用いた。縦軸は RPS6 による補正值であり、各値は平均 \pm 標準誤差 (SEM) で示した (n=4)。VKORC1、RPS6 発現量及び VKORC1/RPS6 の相対発現量の全てで二群間に有意差は認められなかった。

Model 1 (Cys43-Cys51, Cys132-Cys135) & Warfarin



Model 2 (Cys51-Cys132) & VKO

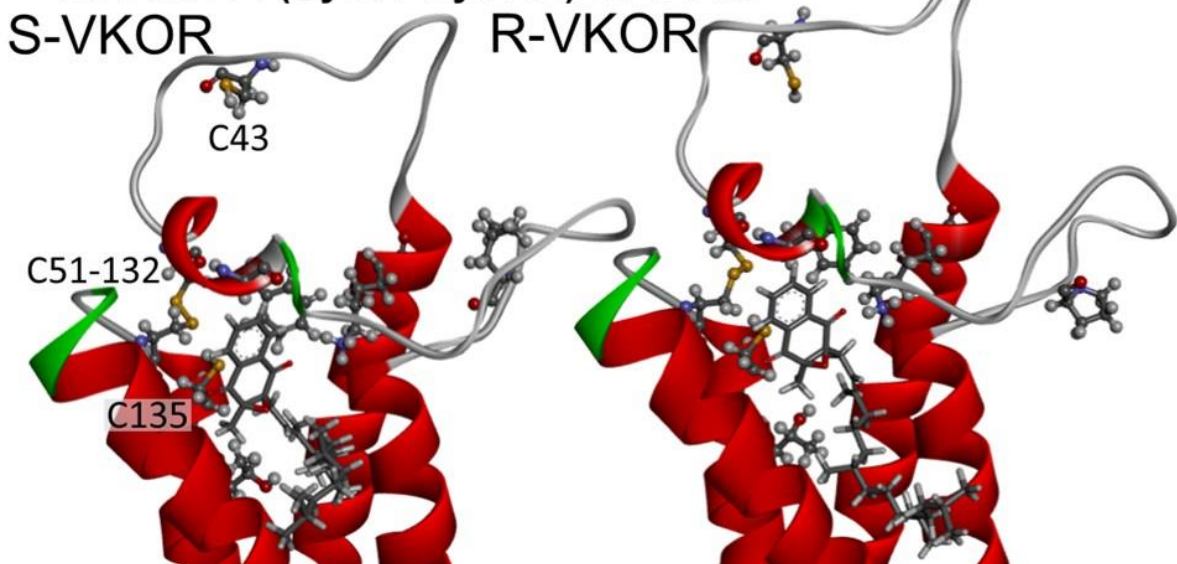


Fig. 2-11 : VKOR とワルファリン/VKO のドッキングポーズ。ドッキングシミュレーションにより予測された VKOR とワルファリンまたは VKO の間のドッキングポーズを示している。S-VKOR : 感受性群の野生型 VKOR (76 位ロイシン)、R-VKOR : 抵抗性群の変異 VKOR (76 位プロリン)。Fig. 2-2 の VKOR 反応スキームに基づき、ワルファリンと VKOR モデル 1 (Cys43-Cys51, Cys132-Cys135)、VKO と VKOR モデル 2 (Cys51-Cys132) の結合結果を示している。ワルファリンと低分子リガンドはスティック図で描写し、VKOR は 3D リボンで示した。また、結合サイト (Lys30、Phe55、Thr138)、活性に必要なシステイン (Cys43、51、132、135) 及び変異部位 (Leu76、Pro76) はボール&スティック図で描写している。本シミュレーションで推定されたドッキングスコアは Table 2-6 に示している。

Table2-6：ドッキングシミュレーションによるスコアリング

Ligand	Protein	Docking score (kcal/mol)	Glide eModel (kcal/mol)
Warfarin	S-VKOR (model 1)	-8.491	-80.551
	R-VKOR (model 1)	-8.013	-73.051
	S-VKOR (model 2)	-8.451	-77.177
	R-VKOR (model 2)	-7.684	-66.361
Vitamin K epoxide	S-VKOR (model 1)	-7.979	-77.886
	R-VKOR (model 1)	-8.913	-82.303
	S-VKOR (model 2)	-8.23	-80.723
	R-VKOR (model 2)	-8.118	-70.826

Schrödinger 社の Small Molecule Discovery suite ソフトウェア、GLIDE 機能の standard precision スコアリングを用いて各 VKOR と低分子リガンドの結合性を評価した。S-VKOR：感受性群の野生型 VKOR (76 位ロイシン)、R-VKOR：抵抗性群の変異 VKOR (76 位プロリン)。VKOR モデル 1：ジスルフィド結合非還元時 (Cys43-Cys51、Cys132-Cys135)、VKOR モデル 2：ジスルフィド結合還元時 (Cys51-Cys132)。ドッキングスコアは結合の強固さの指標となり、eModel スコアは結合予測モデルの信憑性の指標となる。ドッキングスコアでは ≤ -7.0 kcal/mol、eModel スコアでは ≤ -50 kcal/mol が良好な予測モデルとしての閾値として用いられる [62]。

Model 1 (Cys43-Cys51, Cys132-Cys135) & Warfarin

S-VKOR

R-VKOR

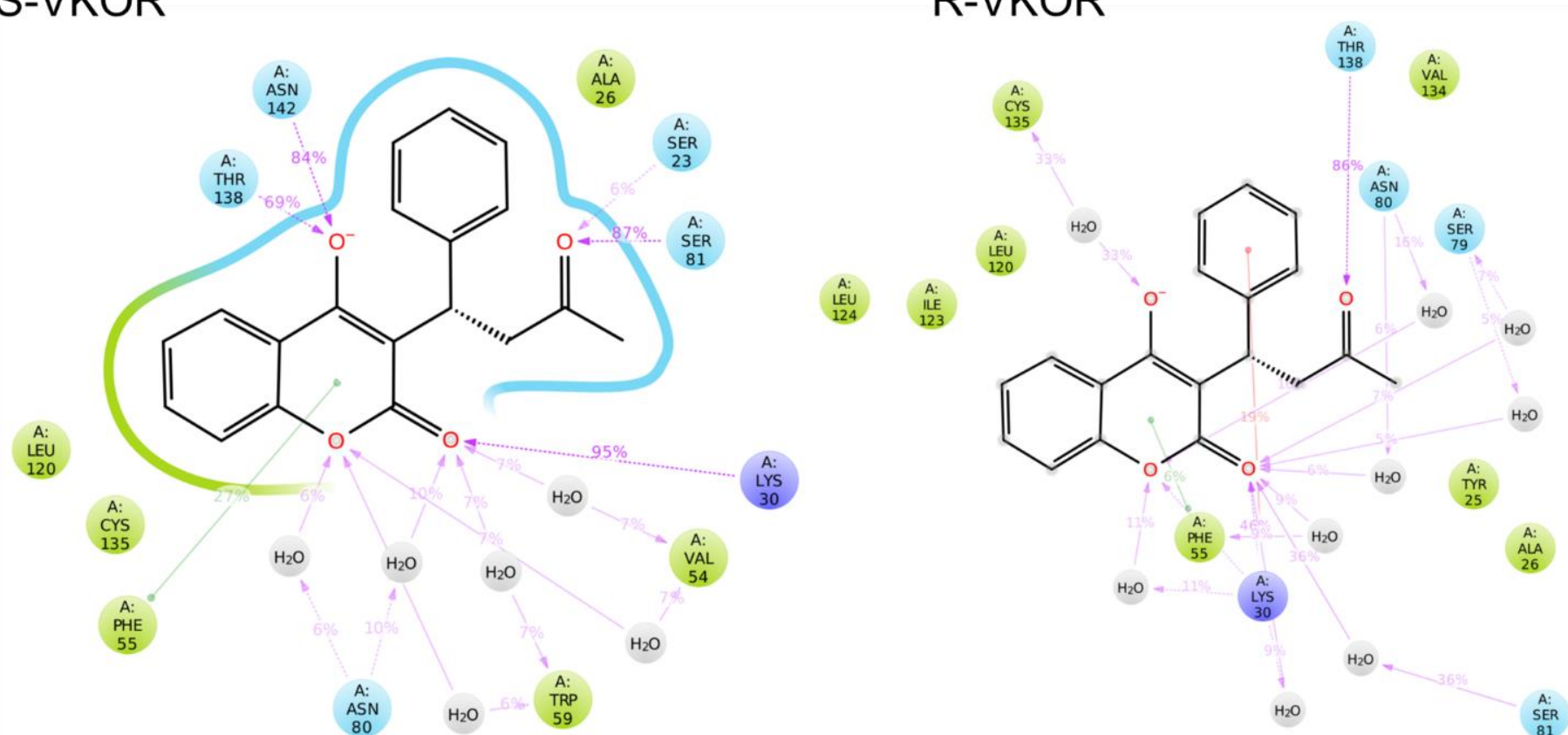


Fig. 2-12 : VKOR とワルファリンの相互作用 2D 図。分子動力学シミュレーションでの VKOR アミノ酸残基とワルファリン原子の相互作用を 2D で示した。50.0 ns のシミュレーション時間の 5.0% 以上で発生する相互作用が矢印で示されている。疎水性相互作用はリガンド周囲に緑色で、イオン相互作用は青色で示されている。また、溶媒に曝されているリガンド中原子は灰色のドットでハイライトされている。S-VKOR : 感受性群の野生型 VKOR (76 位ロイシン)、R-VKOR : 抵抗性群の変異 VKOR (76 位プロリン)。

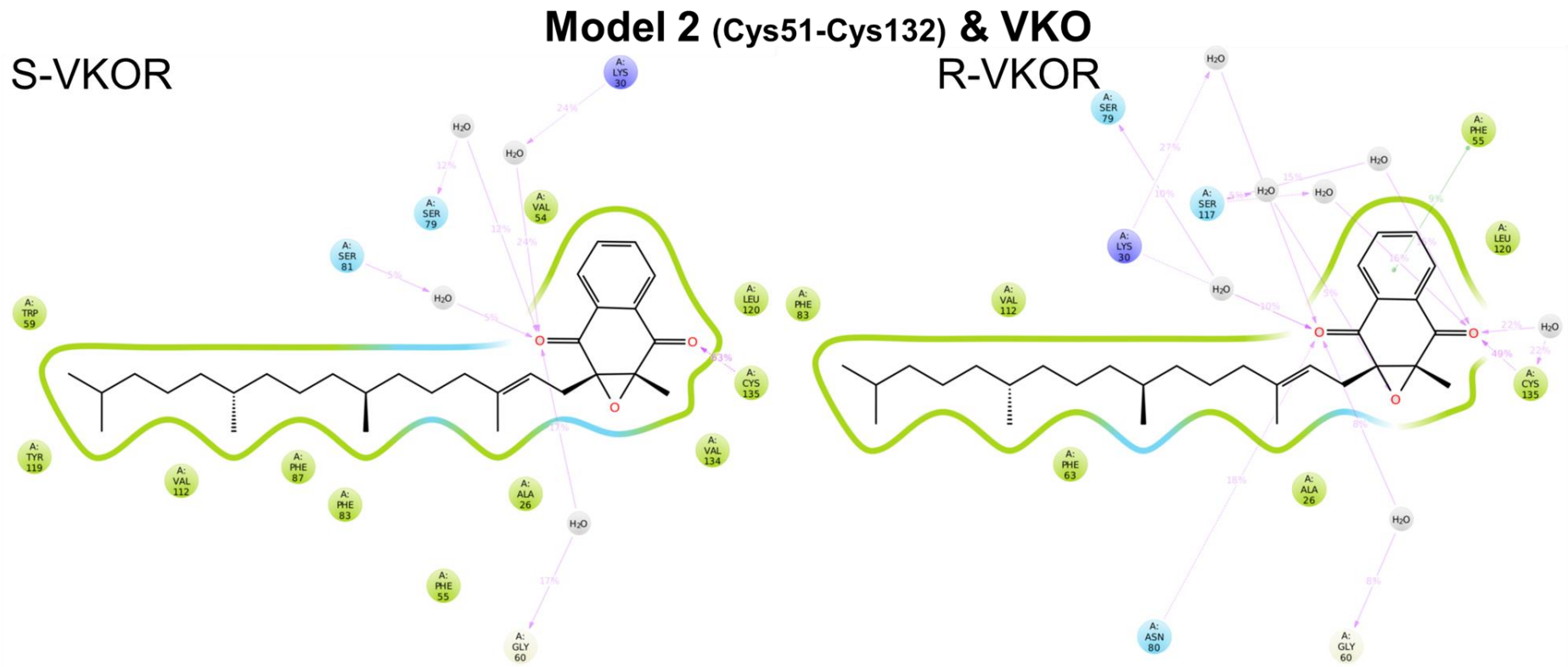


Fig. 2-13 : VKOR と VKO の相互作用 2D 図。分子動力学シミュレーションでの VKOR アミノ酸残基と VKO 原子の相互作用を 2D で示した。100.00 ns のシミュレーション時間の 5.0%以上で発生する相互作用が矢印で示されている。疎水性相互作用はリガンド周囲に緑色で示され、イオン相互作用は青色で示されている。S-VKOR : 感受性群の野生型 VKOR (76 位ロイシン)、R-VKOR : 抵抗性群の変異 VKOR (76 位プロリン)。

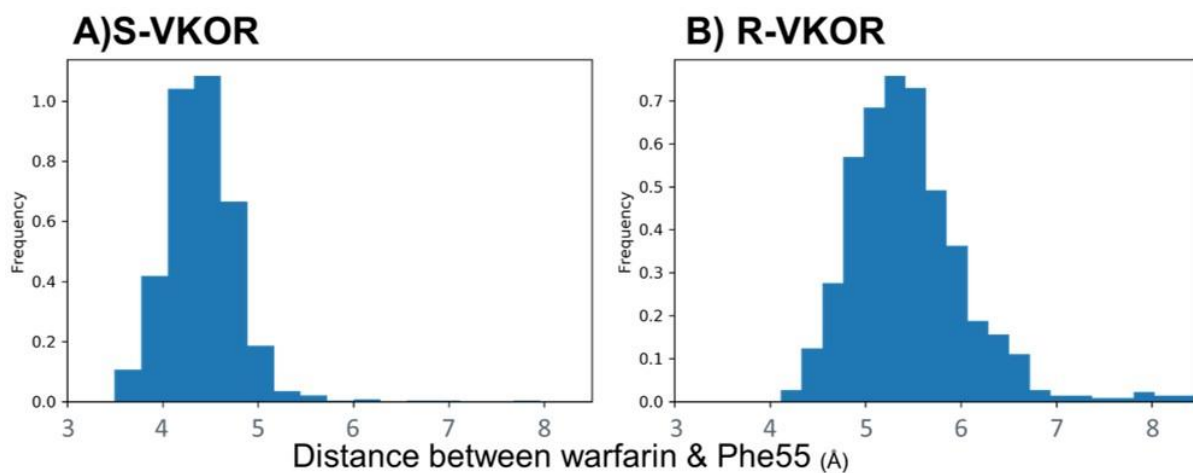


Fig. 2-14 : ワルファリンと VKOR Phe55 間の距離。分子動力学シミュレーション中に測定したワルファリンの芳香環炭素(a7)と VKORC1 の 55 位フェニルアラニン(Phe55)フェノール基間の距離。Phe55 はワルファリンに対する最も強固な結合サイトだと考えられている。50.00 ns のシミュレーション時間で発生する各距離の頻度を表示している。A) S-VKOR : 感受性群の野生型 VKOR (76 位ロイシン)、B) R-VKOR : 抵抗性群の変異 VKOR (76 位プロリン)。

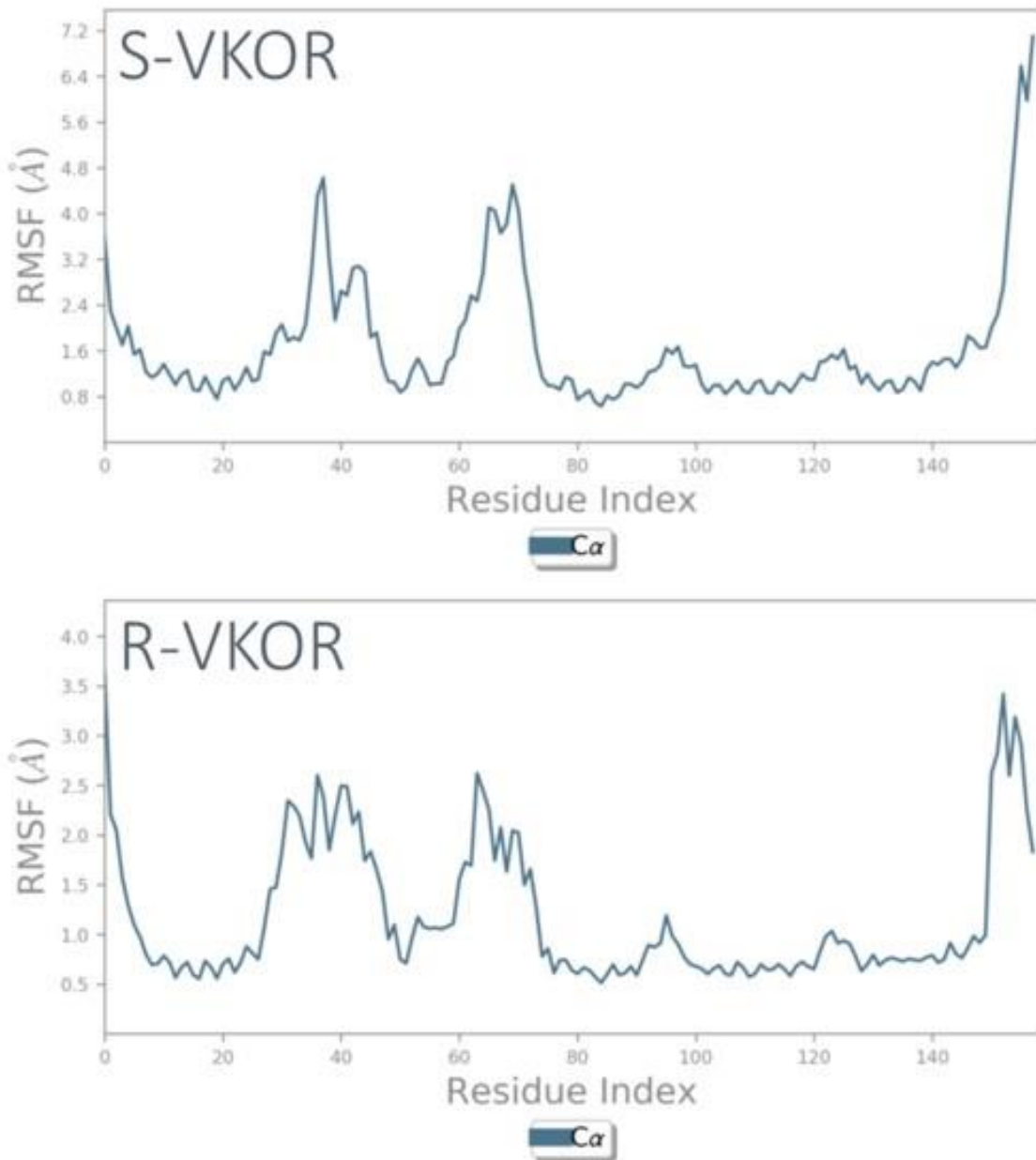


Fig. 2-15 : VKOR の平方根平均二乗揺らぎ (Root Mean Square Fluctuation : RMSF)。RMSF は各原子の基準位置からの揺らぎを数値化した物で、タンパク質構造の可動性の大きさを評価する指標となる。横軸は VKOR 中のアミノ酸残基を示す。S-VKOR : 感受性群の野生型 VKOR (76 位ロイシン)、R-VKOR : 抵抗性群の変異 VKOR (76 位プロリン)。

— 第三章 —

ワルファリン体内動態の *in vivo* 薬物動態/薬力学的解析 *in situ* 肝灌流試験による肝代謝能の解析

背景

第2章ではワルファリンの標的分子、VKORに着目した解析を行った。しかしながら、ワルファリンを含む全ての外来化学物質は生体内で標的分子に作用する際に、消化管・呼吸器からの吸収、標的臓器への分布、代謝酵素による代謝、糞尿等を介した体外への排泄という体内動態を辿る。これらはADMEと総称され、ADMEの各要素も化学物質の個人差、種差の要因となる事が知られている [66]。

ワルファリンは薬物代謝酵素シトクロム P450 (P450、CYP) により 4'-、6-、7-、8-、および 10-OH ワルファリンという 5 つの水酸化体に代謝される [30]。これは主に CYP1A、CYP2B、CYP2C、及び CYP3A サブファミリーにより担われる (Fig. 3-1)。ヒトの臨床に於いては VKOR に加え、このワルファリン代謝を担う P450 の遺伝子多型も治療域に影響を与える。例えば、CYP2C9 と CYP3A5 の遺伝子多型がワルファリン治療の個人差の原因となる事が知られている [67]。また、P450 はさまざまな薬剤によってその発現を誘導される事が知られている。CYP1A は TCDD (2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン) 等芳香族炭化水素化合物により芳香族炭化水素受容体 (AhR) を介しその発現を誘導される他、CYP2 および CYP3 はフェノバルビタールなどの化合物により、構成的アンドロスタン受容体 (constitutive androstane receptor : CAR) やプレグナン X 受容体 (pregnane X receptor : PXR) 受容体を介し発現が誘導される [68-70]。ワルファリン代謝を担う P450 の発現量が増加した場合、その薬効が減弱する可能性がある。

いくつかの殺鼠剤抵抗性齧歯類に於いてもこれらシトクロム P450 の発現が誘導されている事例が報告されている。第二世代殺鼠剤に高頻度で曝露されたカリフォルニアハタネズミ (*Microtus californicus*) は *in vitro* 試験で殺鼠剤の高代謝能を示すという知見がある [33]他、藤田らは農薬が高頻度で散布される地域に生息するハタネズミでは CYP2B 及び 3A の発現量が増加している事を報告した [71]。また、ブロマジオンに曝露された抵抗性ドブネズミでは CYP2E1、2C13、3A2 といった分子種が誘導されているという知見もある [72]。しかしながら、これらの解析はいずれも肝臓から抽出したミクロソーム画分を用いた *in vitro* での酵素反応再現系を用いており、これらの代謝能が生体レベルでの代謝・排泄能の向上に寄与した事を示す知見は乏しい。

そこで、本研究では、抵抗性ラットクローズドコロニーを用いた *in vivo* での薬物

動態・薬力学的解析を実施し、生体レベルでの殺鼠剤への応答を精査すると共に *in situ* 肝臓灌流試験を行い生理的な条件での肝代謝能を観察した。肝灌流は、肝代謝能を調査するための *in situ* 手法である。門脈から対象物質を含む灌流液を通液し、肝臓通過後の灌流液を後大静脈から採取する事で肝臓での異物代謝能を観察する事ができる [73]。P450 の代謝能を観察する手法としてはマイクロソーム画分を用いた *in vitro* での酵素反応再現系や細胞培養などがある。*In vitro* の再現系では P450 に着目した酵素速度論的解析を行う事ができる反面、補酵素の影響等は観察できない。また、P450 は細胞培養では発現量が不安定であり、正確さに欠ける事が指摘されている [74]。これに対し、肝灌流試験では肝臓の生理的な環境を保ちつつ、定量的・特異的に肝代謝能を精査できる点で利点がある。

方法

動物

ワルファリン抵抗性及び感受性クマネズミクローズドコロニー (*Rattus rattus*) はイカリ消毒株式会社から供試された。実験に用いたラットは全てオスであり、平均体重は 112.9 ± 3.1 g であり、推定年齢は 218.3 ± 27.9 日齢であった。これらは 12 時間の明暗周期、 $20^{\circ}\text{C} \sim 23^{\circ}\text{C}$ の室温で飼育し、餌 (CE-2、日本クレア)・水は自由摂取とし、実験前の絶食は実施しなかった。これらを用いての動物実験及び飼育は AAALAC International のガイドラインに従い、北海道大学全学及び大学院獣医学研究院の認証を得て実施した (認証番号 14-0142)。

ワルファリン投与試験

ワルファリンの投与と採血に先立ち、各ラットの頸静脈可視化手術を行った。ラットを三種混合麻酔 (メデトミジン 0.375 mg/kg、ミダゾラム 2.0 mg/kg、ブトルファノール 2.5 mg/kg) の腹腔内投与 (i.p.) で麻酔し、 $2.5\% \sim 3\%$ イソフルランで維持した。その後頸部皮膚を 5 mm 程度切開して頸静脈を露出した。次に、生理的食塩水に溶解したワルファリンナトリウム 10 mg/kg を経口 (p.o.) 投与 ($n=4$) または静脈内 (i.v.) 投与 ($n=4$) した。麻酔からの覚醒までラットの体温は使い捨てカイロで維持した。採血は胸鎖乳突筋を穿刺し頸静脈から行い、毎回約 100 μL を投与後 5 分、 1 、 2 、 4 、 6 、 10 、 26 、 33 、 51 時間後に採血した。採血も $2.5\% \sim 3\%$ のイソフルランの麻酔下で実施した。プロトロンビン時間は 5 分、 6 、 10 、 26 、 33 、および 51 時間で CoaguCheck XS (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用い測定した。 51 時間目の採血終了後にラットはイソフルランの過剰投与により安楽死させ、臓器を収集した。また、各血液はヘパリンで処理した後 $5,000 \times g$ で 5 分間遠心し血漿として -20°C で

保存した。

また、糞尿中への排泄を観察するために、感受性群と抵抗性群のそれぞれに生理的食塩水に溶解したワルファリンナトリウム 10 mg/kg を経口投与した (各 n = 5)。その後、ラットを代謝ケージ (信濃製作所、東京) に入れ、糞・尿を 24 時間、48 時間の 2 点で採取した。実験中餌、水は自由摂食させた。

ワルファリン *in situ* 肝灌流試験

肝灌流は井上、菅野の方法を改変し行った [75,76]。ラットを三種混合麻酔の腹腔内注射により麻酔し、2.5~3% イソフルランで維持した。麻酔導入後、開腹し肝臓、門脈、尾部大静脈、および胆管を可視化した。胆管に PE-10 ポリエチレンチューブ (Becton Dickinson, Sparks, MD) にカニューレを施し、門脈及び後大静脈には No. 4-6 ポリエチレンチューブ (HIBIKI、東京) をカニューレとして挿入した。開腹後は白熱電球により体温を維持した。これらの外科的処置の後、95%酸素 + 5%二酸化炭素を通気したクレブス・リンゲル-HEPES バッファー (115 mM NaCl、5.9 mM KCl、1.2 mM MgCl₂、1.2 mM NaH₂PO₄、1.2 mM Na₂SO₄、2.5 mM CaCl₂、25 mM NaHCO₃、10 mM グルコース、0.1 M HEPES pH = 7.4) を門脈カニューレから MP-2000 ポンプ (EYELA、東京) で 30 mL/min の流量で肝臓へ通液した。15 分間の本バッファーによる灌流を行った後に、0.5 mM のワルファリンを含むバッファーで 30 分間灌流した。その後、再度ワルファリンを含まないバッファーを 15 分間灌流し洗い込みを行った。肝臓通過後の灌流液は後大静脈カニューレを通し 1 分毎に各 5 秒間採取した。胆管カニューレには 1.5 mL エッペンチューブを設置し、滲み出る灌流液を継続的に採取した。ラットは深麻酔下での灌流措置による放血で安楽死させた。

ワルファリンの抽出

ワルファリンと水酸化ワルファリンは、液液分配法で灌流液、血漿、肝臓から抽出した。各サンプル (血漿 5 μ L、灌流液 5 μ L、臓器 20 mg) を 0.1 M の酢酸ナトリウム緩衝液 (pH = 5.0) と混合し、内部標準物質として Phenyl-d5-7-hydroxywarfarin (7-OH-d5-warfarin、100 nM)、脱抱合の基準物質としてオキサゼパムグルクロン酸抱合体 (100 nM) を添加した。これに 5000 unit β -glucuronidase を加え、37°C、オーバーナイトで振盪し水酸化ワルファリンの脱抱合処理を行った。これに 5 mL のジエチルエーテルを添加し激しく振盪後 3,000 \times g で 10 分間延伸し、液液分配を行った。上層 (有機層) を分取し、50°C、窒素風乾により蒸発乾固させた。残渣を 1.0 mL のメタノールに再溶解し、溶液を 15,000 \times g で 10 分間遠心分離し、0.2 μ m Chromatodisc Sample Syringe Filters (GL Science、東京) で濾過した。

ワルファリンの定量

ワルファリンおよび水酸化ワルファリンは、HPLC (Shimadzu 20 Series) とエレクトロスプレーイオン化トリプル四重極質量分析 (ESI/MS/MS、LC-8040、Shimadzu) によって分離・定量した。カラムは C18 カラム (Symmetry Shield、RP18 2.1×150 mm、3.5 μ m、Waters, Milford, MA) を用いた。移動相は 10% メタノール + 90% 10 mM 酢酸アンモニウムバッファー pH 5.0 (A)、および 100% メタノール (B) を下記の B 相濃度グラジエントで適用した。0-2 分:5%、2~15 分:90% への線形グラジエント、15-20 分:90%。サンプル注入量は 10 μ L、流速 0.3 mL/min、カラム温度は 50°C であった。各 MS パラメーターは Table 3-1 に示した。

分析のクオリティコントロール

サンプルからの回収率を調べるために、ワルファリンを含まない血漿、肝臓、クレブス・リンゲルバッファーにワルファリンを添加し回収試験を実施した。ワルファリンを含まない血漿、肝臓及び肝灌流液は SD ラットから採取した。各サンプル (血漿 5 μ L、灌流液 5 μ L、臓器 20 mg) を 2 mL の 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH = 約 5.0) と混合し、4'、6、7、8、10-OH ワルファリン、7-OH-d5-warfarin およびワルファリンの混合物 100 μ L を添加した。その後、上記の手法を用いて液液分配、分析を実施した。この手順を 4 回繰り返し、回収率を算出した。検出限界 (LOD) および定量下限 (LOQ) は標準曲線 (n=10) から算出した。日内変動 (%RSD) および精度 (%RE) も同様に検量線から算出した。これらはそれぞれ低 (10 nM)、中 (50 nM) および高 (200 nM) 濃度の標準混合物を分析した。

ウェスタンブロット

ワルファリン代謝を担う P450 の発現量を灌流後の肝ミクロソーム画分を用いたウェスタンブロットにて半定量した。SDS-PAGE は 10%ポリアクリルアミドゲルに肝ミクロソーム画分を 10 μ g/lane アプライし実施した。本タンパク質はニトロセルロースメンブレンにセミドライ法で転写した後、プロテインフリーブロッキングバッファー (タカラバイオ) で室温にて 1 時間ブロッキングした。一次抗体はヤギ由来抗ラット CYP1A1、2B1、2C6、2C11、3A2、CYP reductase 抗体 (第一純薬、東京) と内在性コントロール遺伝子としてマウス由来抗ラット GAPDH 抗体 (Santa Cruz) を用いた。二次抗体として HRP 標識ロバ由来抗ヤギ IgG 抗体、HRP 標識ヤギ由来抗マウス IgG-rabbit IgG を用いた。検出は Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

統計解析

ワルファリンと水酸化ワルファリンのノンコンパートメントモデル解析 (NCA) は、それぞれの血漿濃度時間データを用い、Phoenix WinNonLin (Certara USA, Inc., Princeton, NJ) で実施した [77]。0~51 時間の曲線下面積 (AUC) は、線形台形規則を使用して算出した。また、生物学的利用率は経口投与と静脈内投与の双方の結果から $(AUC_{p.o.}/dose_{p.o.})/(AUC_{i.v.}/dose_{i.v.})$ という式で算出した。また、肝灌流試験での水酸化ワルファリンの AUC は、GraphPad Prism7 (GraphPad Software Inc.) を使用して計算した。これらのパラメーターの検定は student's *t*-test または Dunnett test にて有意水準 $p < 0.05$ で実施した (JMP 14, SAS Institute, Cary, NC)。

結果

HPLC-ESI-MS/MS によるワルファリン、水酸化ワルファリンの検出

ワルファリンと水酸化ワルファリン、内部標準物質の検出を HPLC-ESI-MS/MS で行った。各化合物のクロマトグラムを Fig. 3-2 に、測定精度の指標となる回収率、定量下限、検出限界を Table 3-1 に示した。

薬力学的解析

Fig. 3-3 はワルファリン経口投与後のプロトロンビン時間の動態である (国際標準比: INR)。プロトロンビン時間は、血液凝固能の指標であり INR が高い程血液が凝固し辛い事を意味する。また、哺乳類に於ける平常時の INR は約 1.0 であり、今回測定に用いた Coagucheck XS の測定上限は 8.0 である。

感受性群 (S-rats) は、投与後 26 時間から PT-INR が大きく上昇し、測定上限の 8.0 以上を示し、投与後 5 分時点の値と比較し 26 時間~51 時間の間有意に高い PT-INR を示した (Dunnett test, $p < 0.05$)。対照的に、抵抗性群では投与後も INR は大きく変化せず、0 時間の値と比較して有意な変化は認められなかった。また、二群間の投与 5 分後の INR に有意差は無かった (Student's *t*-test, $p < 0.05$)。本投与試験を通して抵抗性群、感受性群双方全ての個体が生存し、実験終了後の臓器所見でも消化管や肺等からの出血は認められなかった。

ワルファリン薬物動態学的解析

10 mg/kg のワルファリン投与後の血漿中ワルファリン濃度-時間プロファイルを Fig. 3-4 (p.o.)、Fig. 3-5 (i.v.) に示している。ワルファリン投与は 0 分時点で行われた。また、これを用いた NCA 解析により求められる薬物動態学的パラメーターを Table 3-2 に示す。時間濃度曲線下面積 (AUC) を比較すると抵抗性群では p.o. と i.v. の両方に於いて感受性群と比べ有意に低かった。また、排泄能の指標となるクリアランスは抵抗性群に於いて p.o. と i.v. の両方で有意に高かった。対照的に、生物学

的利用率は両群共に約 70%と有意な差異は認められなかった。

水酸化ワルファリン血中動態学的解析

ワルファリンの代謝産物である水酸化ワルファリンも同様に投与後の血中動態を NCA 解析した (Fig. 3-6/Table 3-3 : p.o., Fig. 3-7/Table 3-4 : i.v.)。10mg/kg の投与後、両群で 5 つ全ての水酸化体を検出された。抵抗性群は i.v.群の 4'-、6-、7-OH 体で有意に早い最高濃度到達時間 (T_{max}) を示した。この傾向は i.v.群の 8-、10-OH 体と経口投与群でも同様に認められたが、有意な差は示さなかった。

臓器への蓄積

肝臓及び腎臓を投与後 51 時間後に採取し、ワルファリンの蓄積量を測定した (Fig. 3-8)。感受性群の肝臓及び腎臓に於けるワルファリン濃度 (肝臓: 1378.4 ± 509.6 ng/g、腎臓: 487.5 ± 300.9 ng/g) はそれぞれ抵抗性群よりも有意に高かった (肝臓: 61.3 ± 16.2 ng/g、腎臓: 29.3 ± 28.2 ng/g、student's *t*-test, $p < 0.05$)。

尿中への排泄

尿中に排泄されたワルファリンとその水酸化体の量を測定した (Fig. 3-9)。投与後 24 および 48 時間で、水酸化体の総量に有意差はなかった。(感受性群: 441 ± 127 μ g、抵抗性群 629 ± 63 μ g)。一方、4'-OH ワルファリンの量は 24 時間及び 48 時間の抵抗性群の尿 (227.5 ± 37.5 μ g) で有意に感受性群の尿 (78.7 ± 21.5 μ g) よりも高かった。また、糞中への排泄については尿中排泄量に比べ量が少なく、総量、及び全ての水酸化体とワルファリンの排泄量に二群間で有意差は認められなかった (data not shown)。

肝灌流試験

ワルファリンの肝代謝活性を肝灌流試験により評価した。Fig. 3-10 は灌流液中の水酸化ワルファリンの濃度を示している。HPLC-ESI-MS/MS による検出の結果、感受性群と抵抗性群双方の灌流液中で 4'、6、7、8、10-OH ワルファリンが検出された。各代謝物の AUC は Table 3-5 に示されている。抵抗性群では 5 つの水酸化体全てで感受性群よりも有意に高い AUC を示した (student's *t*-test, $p < 0.05$)。一方、ワルファリン自体の AUC に有意差はなかった (data not shown)。また、胆管から得られる灌流液の量が両群ともに少なく、胆汁中の排泄量は定量する事が出来なかった。

シトクロム P450 のイムノブロッティング

ウェスタンブロット法を実施して、灌流後の肝臓ミクロソーム画分に於けるワルファリン代謝を担う P450 分子種の発現量を定量した (Fig. 3-11)。CYP2C6 を除き、抵

抗性群は感受性群と比較し有意に高い P450 タンパク質発現量 (1.2~1.3 倍) を示した。

考察

本研究では、抵抗性ラットに於けるワルファリンの体内動態と肝代謝能を *in vivo* 薬物動態学的/薬力学的解析と *in situ* 肝灌流試験により解析した。薬物動態学的解析では、抵抗性群は経口投与と静脈内投与の双方でワルファリンの低 AUC と高クリアランスを示した (Fig. 3-4、5)。本結果は、抵抗性群ではワルファリンの体内からの排泄が亢進している事を示唆する。一方、経口投与と静脈内投与の比から算出した生物学的利用率には有意差がなかった事から、消化管からの吸収率或いは初回通過効果には大きな差がない事が示唆された (Table 3-2)。ワルファリンは吸収率が極めて高くヒト、齧歯類では上部消化管から 99%が速やかに吸収される事が知られている [78]。本研究でも、抵抗性群・感受性群共に経口投与後 5 分時点で高濃度のワルファリンが血漿中から検出され迅速な吸収が行われていると考えられる。

抵抗性群で確認された迅速な排泄の一因として肝臓でのシトクロム P450 による水酸化能が高くワルファリンを迅速に代謝できるという可能性が考えられる。水酸化ワルファリンの薬物動態を比較すると、静脈内投与に於いて抵抗性群では投与後 1 時間で全ての水酸化体が最高濃度に達しその後減少するという特徴的な動態を示し、実際に 4'-、6'-、7-OH 体の最高濃度到達時間 T_{max} は抵抗性群の方が感受性群よりも有意に早かった (Table 3-4)。この傾向は、頸静脈投与の他の水酸化体と経口投与の全ての水酸化体に於いても有意差は認められなかったが、同様に観察された (Table 3-3)。

しかしながら、尿中への排泄量を比較すると 4'-OH ワルファリンを除いて、その排泄総量に有意差はなかった (Fig. 3-9)。薬物動態学的解析の結果から鑑みると、感受性群・抵抗性群双方で、投与後 24 時間で血中から大部分のワルファリンが消失しており、投与後 24 時間以降では両群共に大部分が既に尿中へ排泄されてしまったためだと考えられる。尿中への排泄速度をより詳細に解明するには投与直後の尿をカテーテルで採取する等して、より短い時間軸で経時的に測定する必要がある。一方、肝臓・腎臓中への残留量を比較すると、抵抗性群では感受性群より有意に低かった。しかしこの残留量は排泄量の 1/1000 オーダーであり、総摂取量に対して微細なオーダーの差である。

また、ワルファリンには S-ワルファリンと R-ワルファリンの鏡像異性体が存在し、一部異なる生理学的特性を示す事が知られている。薬効は S-体の方が強いが、クリアランスも S-体の方が高く排泄されやすい [79]。また、P450 での代謝についてはヒトでは S-体の大部分は CYP2C9 で 7-OH 体に代謝され、R-体はその他の水酸化体へ代

謝される傾向が高い [80]。ワルファリンは医薬品としては鏡像異性体を等量含むラセミ体として用いられる。本研究でもワルファリンナトリウムのラセミ体を投与したが、本研究ではワルファリン、OH ワルファリン共に HPLC-MS/MS での鏡像異性体の分離は出来なかった。

肝代謝能を精査するために、これらのラットを用いて肝灌流試験を実施し生理的に近い条件での肝代謝能を評価した。その結果、抵抗性群では5つ全ての水酸化体で感受性群よりも有意に高い生成量 (AUC) を示し、実際に肝臓での高いワルファリン水酸化代謝能を有する事が示唆された (Fig. 3-10)。今回は代謝の第一段階であり律速酵素になると考えられる P450 による水酸化能に着目したが、ワルファリンはその後グルクロン酸抱合を受け、尿中・胆汁中に排泄される。ワルファリンのグルクロン酸抱合はヒトにおいて UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) の UGT1A 分子種 (1A1、1A3、1A8、1A9、1A10) が担う事が知られている [81,82]。一般にグルクロン酸抱合体は多剤耐性関連タンパク質 1 (MRP1) で血液中へ排泄される他、胆管側多選択性有機アニオン輸送体 (cMOAT) により胆汁へ排泄される。本研究では胆管からの灌流液排泄量が少なかったため、胆汁中排泄量を定量する事はできなかった。SD ラットを用いた予備試験では胆管からの灌流液量は体重依存性に増加し、分析に十分な量が分泌されるには少なくとも 250 g 程度の体重が必要であった (data not shown)。今回実験に供試したクマネズミの体重が平均 112.9 g であり、一般にクマネズミの方がドブネズミより小さい事を考えると肝灌流試験ではクマネズミでの胆管排泄量を定量するのは困難だと考えられる。今後、抵抗性群に於けるワルファリン代謝・排泄能をより詳細に解析するには、UGT1A 分子種によるワルファリンのグルクロン酸抱合能や cMOAT を介した胆汁排泄能等も別の手法で評価する事が求められる。

また、これらの肝代謝を担う P450 の発現量をウェスタンブロット法にて半定量すると、CYP2C6 以外の分子種で抵抗性群の方が有意に高い相対発現量を示した (Fig. 3-11)。一方、肝灌流試験での AUC を比較すると抵抗性群が 2.6~8.5 倍程度高い値を示している (Table 3-5) のに対して、タンパク質発現量では 1.2~1.3 倍程度に留まっており、肝代謝能に対して変化の幅は比較的小さく、この P450 発現量が高代謝能の原因を全て説明し得るかは不透明である。また、ワルファリンがこれらの P450 分子種の遺伝子発現を誘導するという知見は乏しい。このため、高代謝能の原因については P450 酵素抽出画分等を用いて精査する必要がある。また、4'-OH 体は血中動態、肝灌流の双方で一番高い AUC を示し齧歯類での主要代謝経路である事が示唆された。4'水酸化反応は CYP2B1 と 2C11 で担われる。特にラットの CYP2C11 は雄特有の酵素であることが知られているため、雌に於いても同様の知見が得られるか性差を検討する事が期待される [83,84]。

投与試験においてワルファリンの薬効の指標となるプロトロンビン時間 (PT-INR) を解析した結果、抵抗性群では 10 mg/kg の単回投与ではプロトロンビン時間が有意に上昇しない事が分かった (Fig. 3-3)。また、ワルファリンの単回投与での半数致死量 LD_{50} は 58 mg/kg である他、ワルファリンは反復摂取で薬効が増強される事が知られており、5 日間の継続摂取での LD_{50} は合計 17 mg/kg (3.4 mg/kg/day) である [85–87]。これらと比較して決して少なくない 10 mg/kg の単回投与で薬効が発現しなかった事から本抵抗性群は顕著な抵抗性を示していると言う事ができる。その原因として、本抵抗性群は VKOR 変異と高ワルファリン代謝・排泄能の 2 つを有している。各要素がどの程度の割合で抵抗性に寄与しているかは本試験系から判断する事はできないが、投与後 10 時間後から有意ではないものの上昇傾向にあった PT-INR が投与後 31 時間から下がりはじめ正常値に復帰する様な挙動を見せている事から、迅速な解毒排泄能も少なからず抵抗性に寄与していると考えられる。また、ワルファリンは殺鼠剤として用いられる際に持続曝露で致死効果を示す蓄積毒として用いられる事から、高解毒排泄能は、持続曝露という実際に野外で殺鼠剤を摂取する際の曝露状況では、顕著に抵抗性に寄与する可能性もある。

小括

今回用いた抵抗性群は第 2 章で確認された Leu76Pro という VKOR 変異を有するのに加えて、*in situ* 肝灌流試験ではワルファリンの高い肝代謝能を有している事が明らかとなり、*in vivo* 薬物動態学的試験では恐らくそれに起因する高排泄能を有している事が判明した。また、薬力学的試験では実際に生体レベルでもワルファリンの薬効が発現し辛い事も明らかとなった。今後もこの高代謝排泄能のメカニズムをより詳細に検討する必要がある。

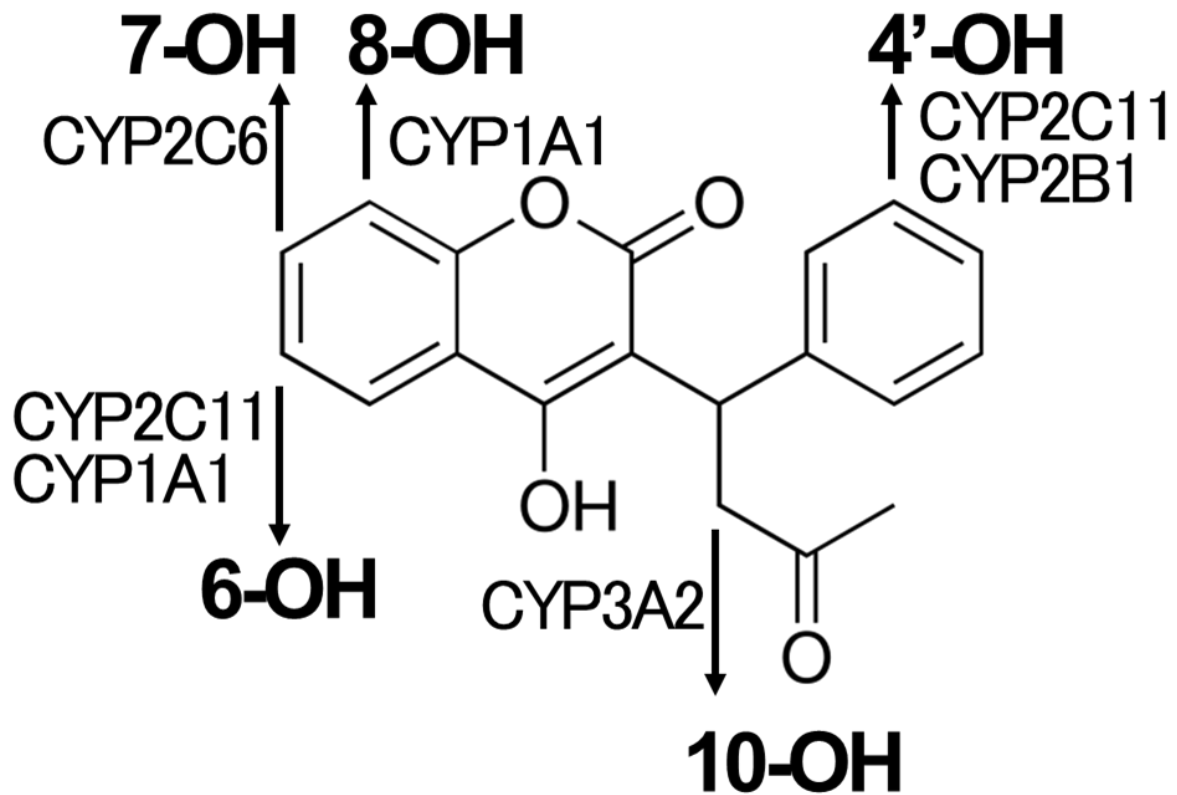


Fig. 3-1: ラットに於けるワルファリン水酸化代謝経路。ワルファリンは複数のシトクロム P450 分子種 (CYP) により 4'-、6-、7-、8-、10-水酸化 (OH) 体へ水酸化される。

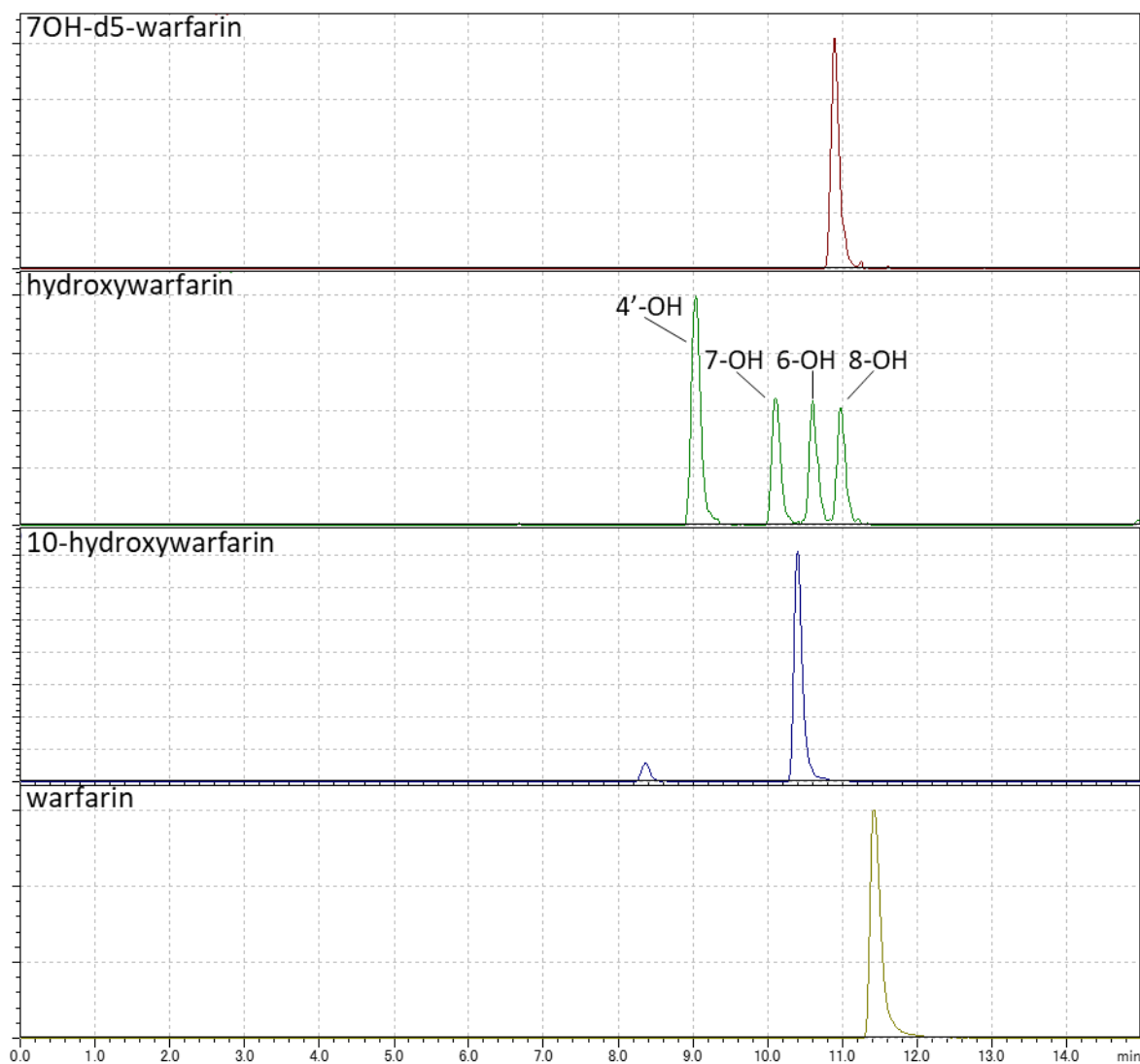


Fig. 3-2: ワルファリンと水酸化ワルファリンのクロマトグラフ。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離の後、エレクトロスプレーイオン化質量分析計 (ESI-MS/MS) で定量した。これらの ESI-MS/MS 分析条件とその分析精度は Table 3-1 に示した。

Table 3-1：ワルファリンと水酸化ワルファリンの分析条件・分析精度

	Intraday precision (%RSD) and accuracy (%RE)				Innerday precision (%RSD) and accuracy (%RE)				Recovery rate (%)	LOD (nM)	LOQ (nM)
	RSD			RE	RSD			RE			
	10 nM	50 nM	200 nM		10 nM	50 nM	200 nM				
4'-OH	13.11	12.21	14.90	1.09	13.59	12.32	15.20	0.64	77.34±5.84	10.1	30.6
6-OH	12.61	11.37	13.14	2.69	8.62	6.51	10.34	0.63	78.88±8.29	7.89	23.91
7-OH	17.63	15.02	14.27	1.09	12.78	5.71	6.51	1.51	82.11±14.12	7.38	22.35
8-OH	15.49	11.06	14.04	1.37	12.69	9.63	6.21	2.69	84±5.91	7.89	23.91
10-OH	13.23	14.93	17.50	2.21	13.83	11.94	8.64	1.15	106.97±3.78	8.12	24.62
Warfarin	19.70	15.49	15.33	2.05	5.66	5.81	3.77	0.38	94.68±6.37	36.21	109.74
d5-7-OH	13.32	11.92	13.35	0.51	11.18	6.10	6.34	1.37	83.76±8.65	/	/

高速液体クロマトグラフィーエレクトロスプレーイオン化法質量分析計（HPLC-ESI-MS/MS）で検出・定量したワルファリンと内部標準物質の分析条件と分析精度を示した。分析精度の指標として液液分配後の各回収率と検出限界（LOD）と定量下限（LOQ）を肝ミクロソーム画分に各化合物の分析標準品を添加しての添加回収試験を行い算出した。

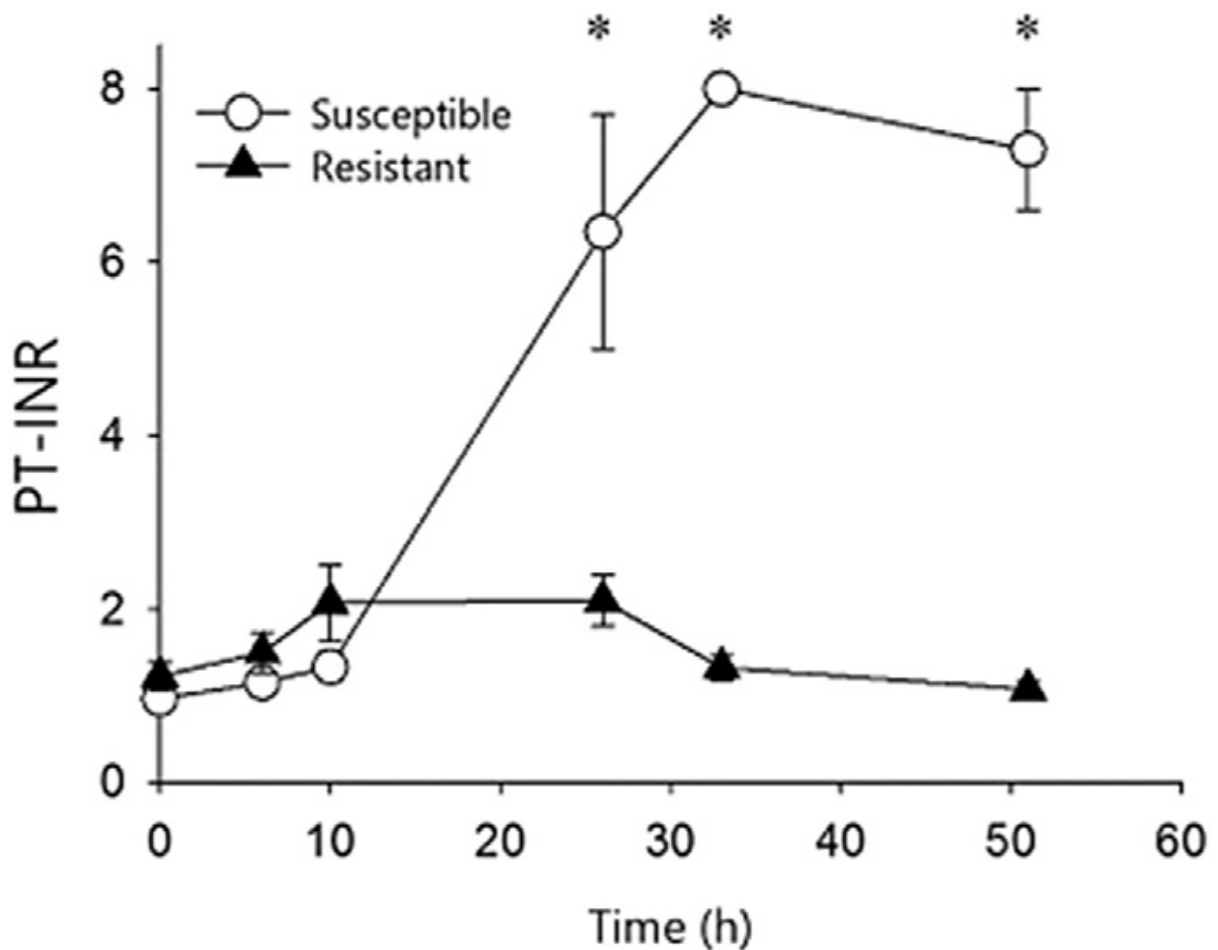


Fig. 3-3: ワルファリンの薬力学的解析。ワルファリンの抗血液凝固作用の指標としてワルファリンナトリウム 10 mg/kg 経口投与後のプロトロンビン時間国際標準比 (PT-INR) を測定した。哺乳類での PT-INR 正常値は約 1.0 で、今回測定に用いた CoaguCheck XS の測定上限は 8.0 である。○: 感受性群、▲: 抵抗性群。各プロットは平均 ± 標準誤差 (SEM) で表した (n = 4)。*は、5 分時点の PT-INR 値と比較して有意に高い値を示す (Dunnett test、 $p < 0.05$)。

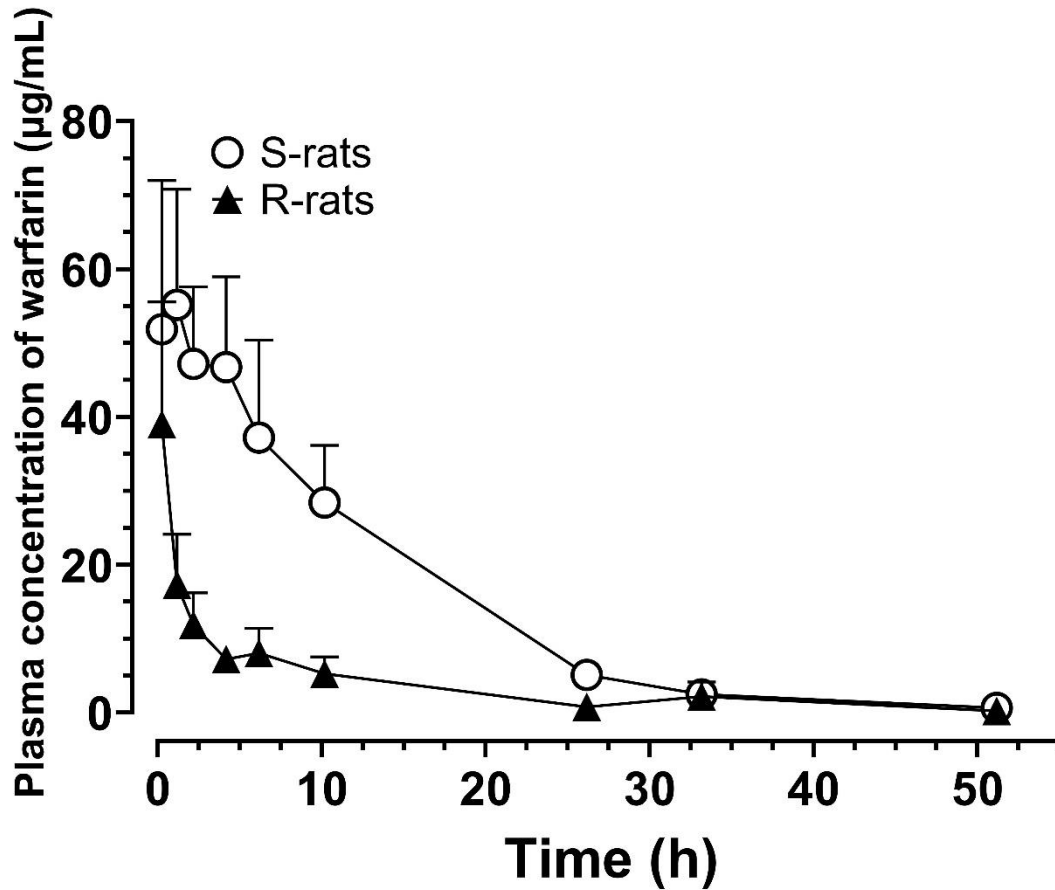


Fig. 3-4 : 血漿中ワルファリン濃度の推移 (経口投与)。表中 0 分でワルファリンナトリウム 10 mg/kg を経口投与した後の血漿中ワルファリン濃度を測定した。○ : 感受性群 (S-rats)、▲ : 抵抗性群 (R-rats)。各プロットは平均 ± 標準誤差 (SEM) で表した (n = 4)。本ワルファリン濃度-時間プロファイルを Phoenix WinNonLin (Certara USA, Inc., Princeton, NJ) を用いたノンコンパートメント解析 (NCA) する事で得られた薬物動態学的パラメーターは Table 3-2 に示した。

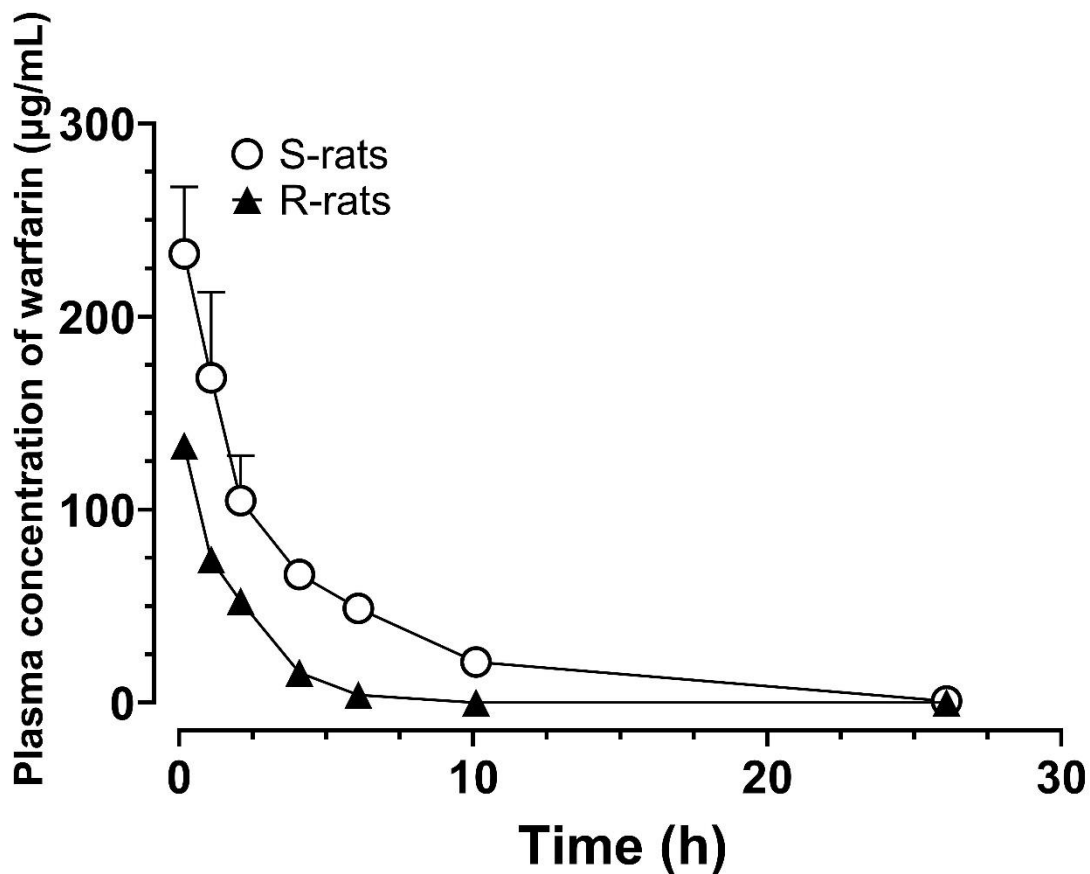


Fig. 3-5 : 血漿中ワルファリン濃度の推移 (静脈内投与)。表中 0 分でワルファリンナトリウム 10 mg/kg を静脈内投与後の血漿中ワルファリン濃度を測定した。○ : 感受性群 (S-rats)、▲ : 抵抗性群 (R-rats)。各プロットは平均 ± 標準誤差 (SEM) で表した (n = 4)。本ワルファリン濃度-時間プロファイルを Phoenix WinNonLin (Certara USA, Inc., Princeton, NJ) を用いたノンコンパートメント解析 (NCA) する事で得られた薬物動態学的パラメーターは Table 3-2 に示した。

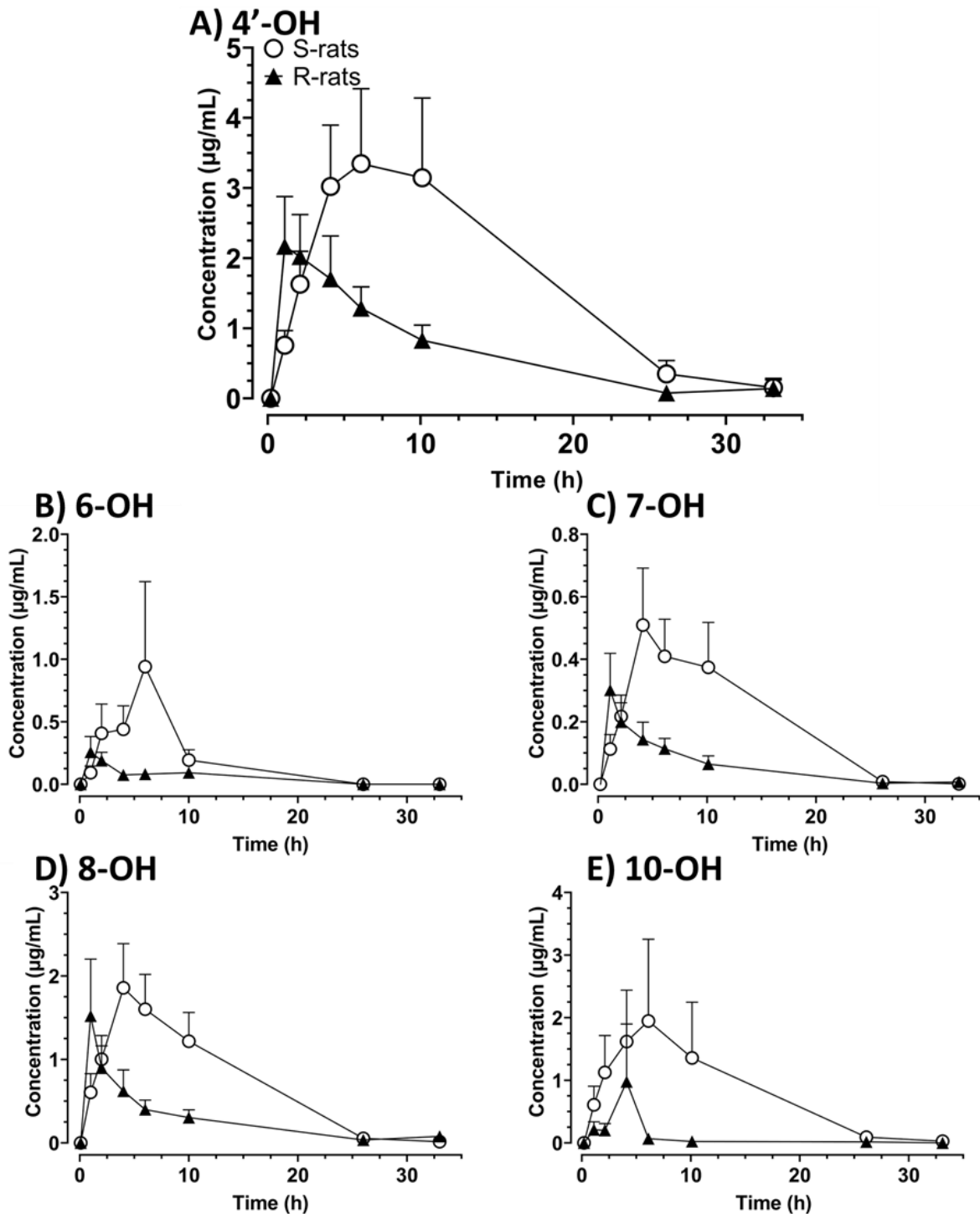


Fig. 3-6：血漿中水酸化ワルファリン濃度の推移（経口投与）。表中0分でワルファリンナトリウム 10 mg/kg を経口投与後の血漿中水酸化（OH）ワルファリン濃度を測定した。○：感受性群（S-rats）、▲：抵抗性群（R-rats）。各プロットは平均 ± 標準誤差（SEM）で表した（n=4）。各血中動態をノンコーパメントメント解析（NCA）する事で得られた薬物動態学的パラメーターは Table 3-3 に示した。A：4'-OH ワルファリン、B：6-OH ワルファリン、C：7-OH ワルファリン、D：8-OH ワルファリン、E：10-OH ワルファリン。

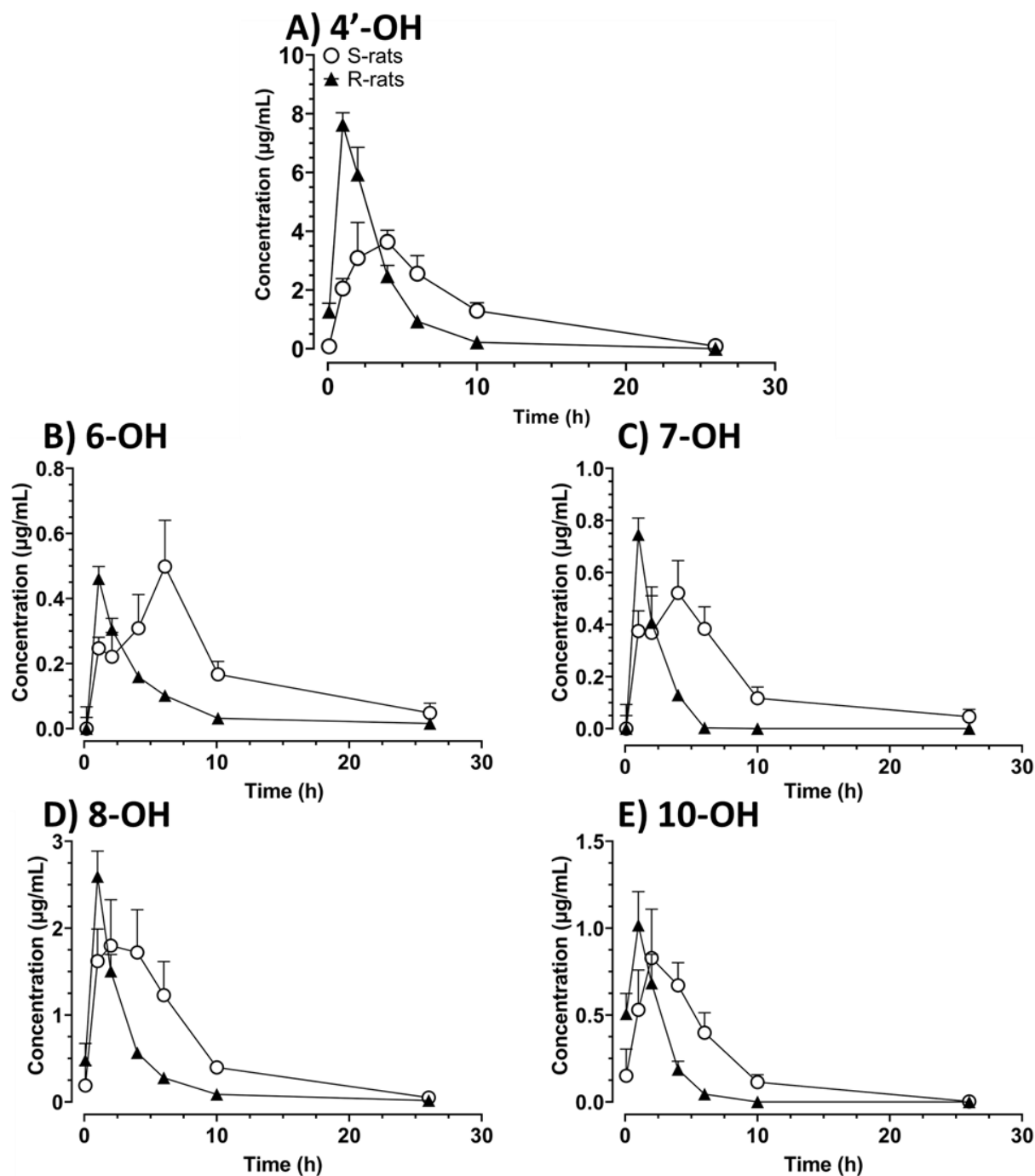


Fig. 3-7 : 血漿中水酸化ワルファリン濃度の推移 (静脈内投与)。表中 0 分でワルファリンナトリウム 10 mg/kg を静脈内投与後の血漿中水酸化 (OH) ワルファリン濃度を測定した。○ : 感受性群 (S-rats)、▲ : 抵抗性群 (R-rats)。各プロットは平均 ± 標準誤差 (SEM) で表した (n = 4)。各血中動態をノンコーパメントメント解析 (NCA) する事で得られた薬物動態学的パラメーターは Table 3-4 に示した。A : 4'-OH ワルファリン、B : 6-OH ワルファリン、C : 7-OH ワルファリン、D : 8-OH ワルファリン、E : 10-OH ワルファリン。

Table 3-2：ワルファリンの薬物動態学的パラメーター

		C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	AUC ($\mu\text{g/mL}$) / h	Clearance ($\mu\text{L/h}$)	Bio- availability (%)
S-rats	p.o.	72.50 \pm 11.07	728.52 \pm 161.49	1927.9 \pm 308.1	69.53
	i.v.	232.61 \pm 34.61	877.93 \pm 142.87	137.23 \pm 27.02	
R-rats	p.o.	40.29 \pm 15.88	182.71 \pm 58.72*	8014.6 \pm 2264.5*	72.34
	i.v.	133.09 \pm 6.57	252.88 \pm 15.35*	409.08 \pm 30.16*	

ワルファリン血中動態 (Fig. 3-4、3-5) のノンコーパントメント解析により得られた薬物動態学的パラメーター。各値は平均 \pm 標準誤差 (SEM) で表した ($n=4$)。

* は二群間で有意差がある事を示す(Student's t -test, $p < 0.05$)。S-rats：感受性群、R-rats：抵抗性群、 C_{max} ：最高血漿中濃度、AUC：血漿中濃度-時間曲線下面積、Clearance：血漿中クリアランス、Bioavailability：生物学的利用率、p.o.：経口投与、i.v.：静脈内投与

Table 3-3：水酸化ワルファリンの薬物動態学的パラメーター（経口投与）

4'-OH	T_{max} (h)	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	AUC ($\text{h}\times\mu\text{g/mL}$)
S-rats	6.50 ± 1.26	3.42 ± 1.06	53.41 ± 15.40
R-rats	1.19 ± 0.08	2.52 ± 0.47	23.14 ± 2.75
6-OH			
S-rats	5.50 ± 0.58	0.91 ± 0.64	5.58 ± 2.50
R-rats	2.25 ± 1.25	0.27 ± 0.10	1.70 ± 0.44
7-OH			
S-rats	5.50 ± 1.50	0.53 ± 0.18	5.02 ± 1.81
R-rats	2.25 ± 1.25	0.32 ± 0.09	1.82 ± 0.24
8-OH			
S-rats	5.00 ± 0.58	1.12 ± 0.29	15.64 ± 4.70
R-rats	2.25 ± 1.25	1.00 ± 0.28	$6.68 \pm 0.86^*$
10-OH			
S-rats	6.5 ± 1.26	1.05 ± 0.47	14.01 ± 5.93
R-rats	3.00 ± 1.22	$0.49 \pm 0.37^*$	$2.37 \pm 1.63^*$

経口投与後の水酸化（OH）ワルファリン血中動態（Fig. 3-6）のノンコーパントメント解析により得られた薬物動態学的パラメーター。各値は平均 \pm 標準誤差（SEM）で表した（ $n = 4$ ）。* は二群間で有意差がある事を示す(Student's t -test, $p < 0.05$)。S-rats：感受性群、R-rats：抵抗性群、 C_{max} ：最高血漿中濃度、 T_{max} ：最高濃度到達時間、AUC：血漿中濃度-時間曲線下面積

Table 3-4：水酸化ワルファリンの薬物動態学的パラメーター（静脈内投与）

4'-OH	T_{max} (h)	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	AUC ($\text{h}\times\mu\text{g/mL}$)
S-rats	3.50 ± 0.50	3.87 ± 0.62	35.82 ± 6.36
R-rats	$1.25 \pm 0.25^*$	$7.54 \pm 0.41^*$	24.42 ± 2.70
6-OH			
S-rats	5.50 ± 0.50	0.524 ± 0.129	7.23 ± 2.12
R-rats	$1.00 \pm 0.00^*$	0.461 ± 0.038	1.70 ± 0.12
7-OH			
S-rats	4.00 ± 0.82	0.572 ± 0.102	6.05 ± 1.20
R-rats	$1.25 \pm 0.25^*$	0.756 ± 0.059	$1.63 \pm 0.19^*$
8-OH			
S-rats	2.00 ± 0.71	1.94 ± 0.48	16.59 ± 2.98
R-rats	1.00 ± 0.00	2.59 ± 0.29	$7.50 \pm 0.58^*$
10-OH			
S-rats	2.25 ± 0.63	0.93 ± 0.22	5.45 ± 1.43
R-rats	1.00 ± 0.00	1.02 ± 0.19	2.79 ± 0.61

静脈内投与後の水酸化（OH）ワルファリン血中動態（Fig. 3-7）のノンコーパントメント解析により得られた薬物動態学的パラメーター。各値は平均 \pm 標準誤差（SEM）で表した（ $n = 4$ ）。* は二群間で有意差がある事を示す（Student's t -test, $p < 0.05$ ）。S-rats：感受性群、R-rats：抵抗性群、 C_{max} ：最高血漿中濃度、 T_{max} ：最高濃度到達時間、AUC：血漿中濃度-時間曲線下面積

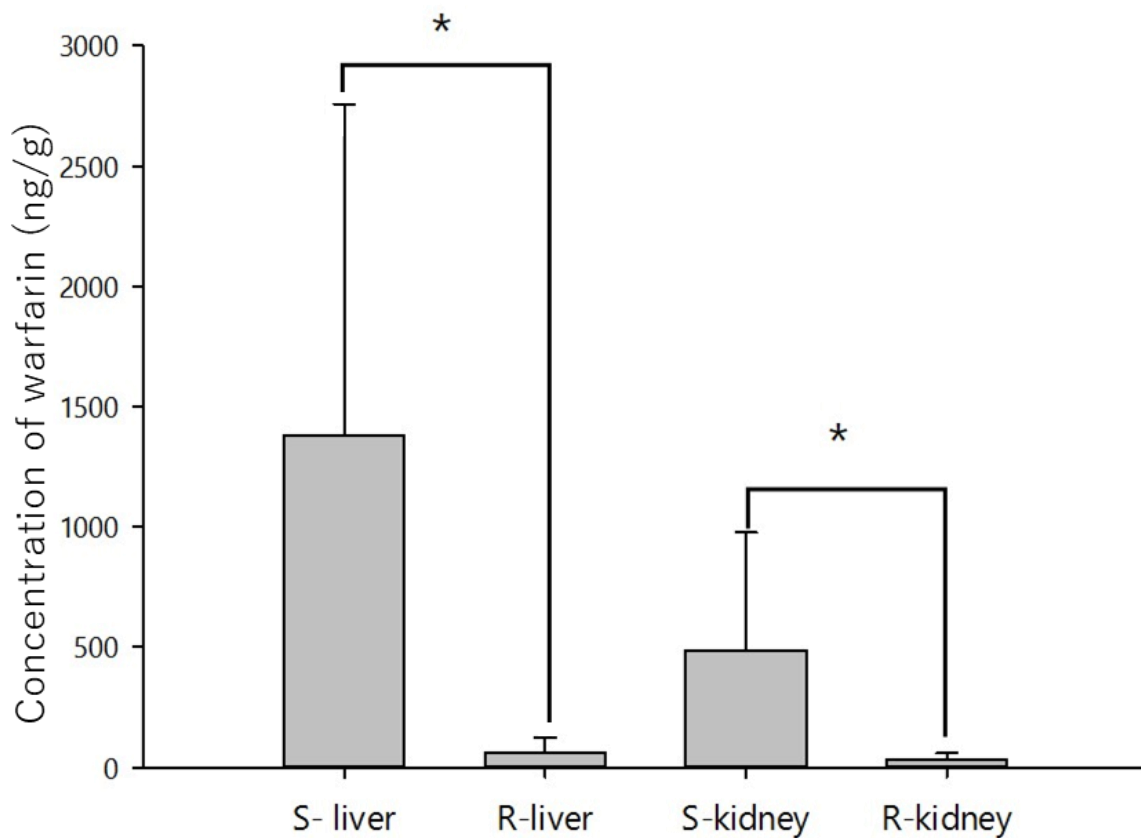


Fig. 3-8 : ワルファリン投与 51 時間後の肝臓、腎臓中ワルファリン濃度。ワルファリン経口投与後 51 時間時点での感受性群 (S-) と抵抗性群 (R-) の肝臓、腎臓中ワルファリン濃度 (ng/g wet weight)。各値は平均 ± 標準誤差 (SEM) で表した (n=4)。* は二群間で有意差がある事を示す (Student's *t*-test, $p < 0.05$)。

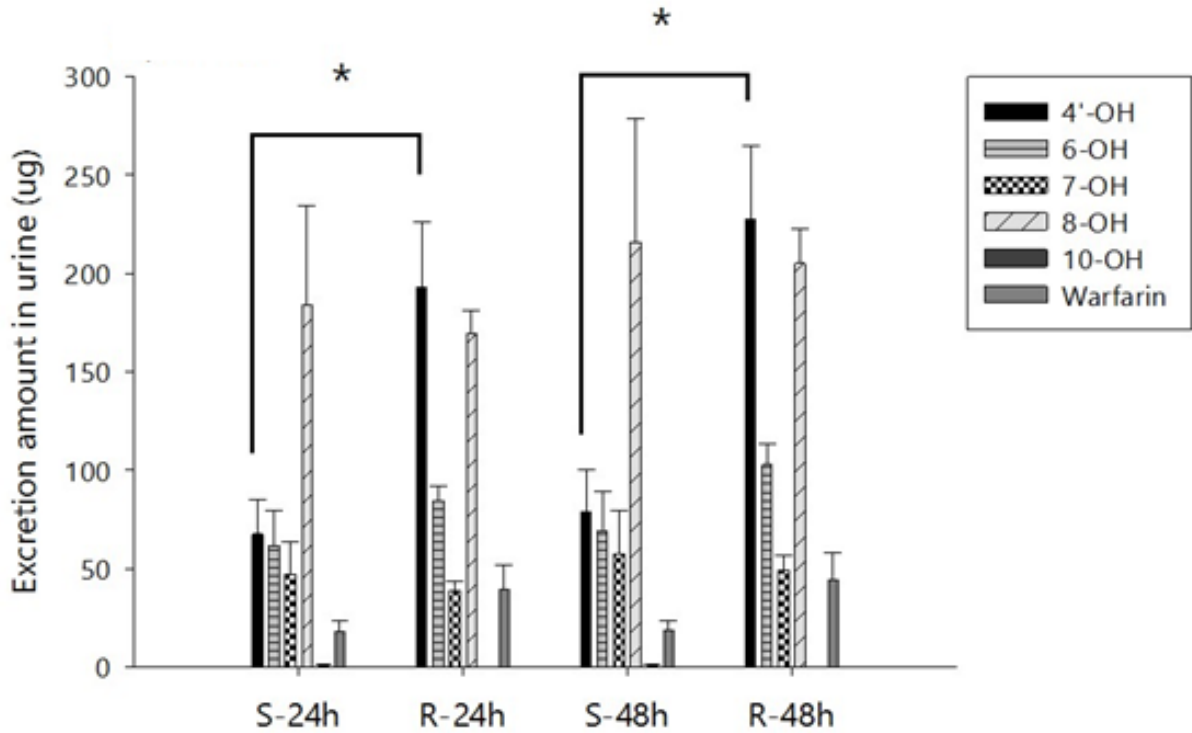


Fig. 3-9 : 尿中へのワルファリン・水酸化ワルファリン排泄量。ワルファリン経口投与後 24 時間、48 時間で尿中へのワルファリンと水酸化 (OH) ワルファリン排泄総量 (μg)。感受性群 (S-) と抵抗性群 (R-) それぞれにワルファリンナトリウム 10 mg/kg を経口投与後に、1 匹ずつ個別の代謝ケージに入れ排泄物を採取した。各値は平均 \pm 標準誤差 (SEM) で表した ($n=5$)。* は二群間で有意差がある事を示す (Student's *t*-test、 $p < 0.05$)。

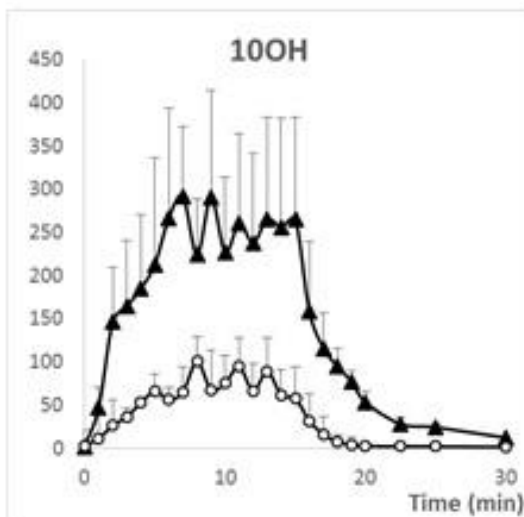
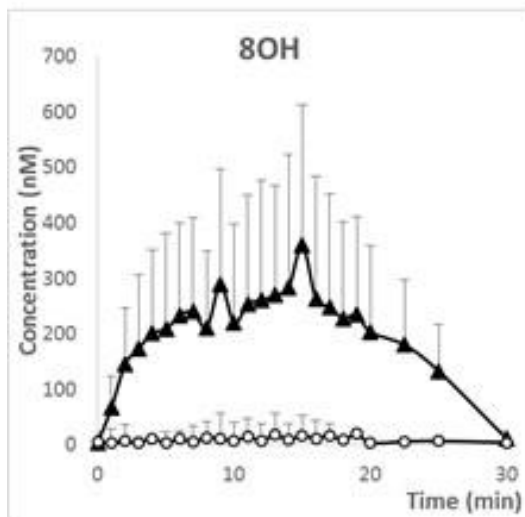
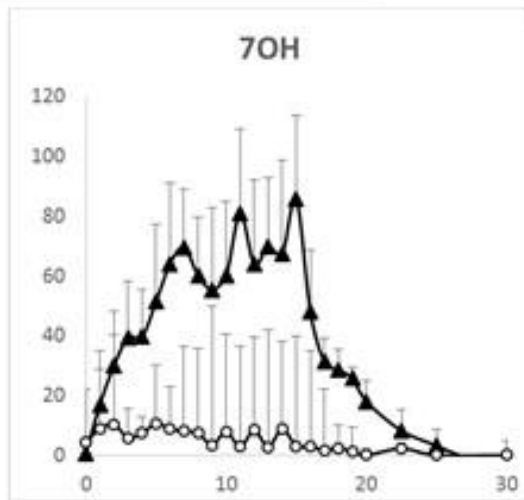
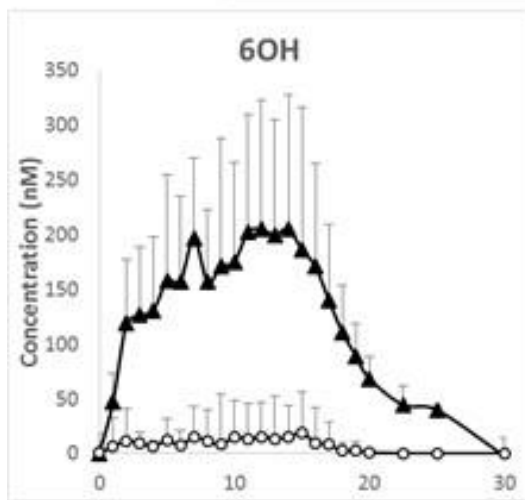
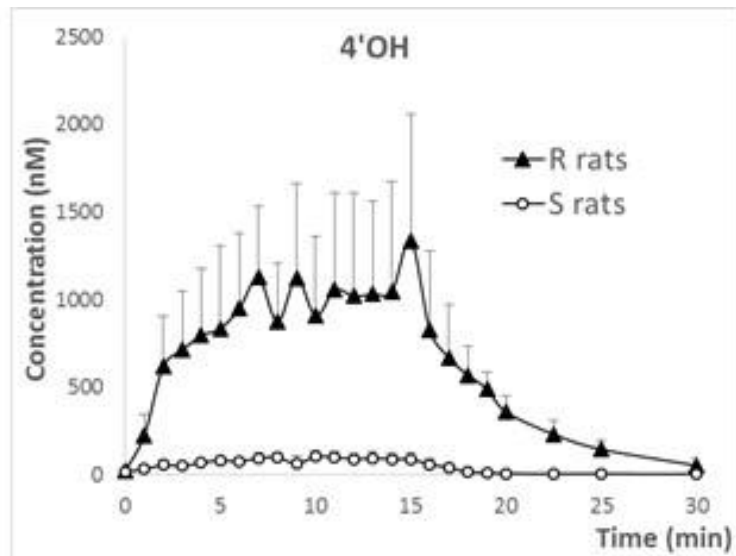


Fig. 3-10 : 肝灌流試験での灌流液中水酸化ワルファリン濃度の推移。○ : 感受性群、▲ : 抵抗性群。各プロットは平均 ± 標準誤差 (SEM) で表した (n = 4)。この図から計算した濃度-時間曲線下面積 (AUC) は Table 3-5 に示した。

Table 3-5 : 灌流液中水酸化ワルファリン濃度-時間曲線下面積 (AUC)

AUC (nM/min)	4'-OH	6-OH	7-OH	8-OH	10-OH
R-rats	9983 ± 1753*	1709 ± 294*	739 ± 235*	1211 ± 241*	2376 ± 109*
S-rats	1389 ± 333	196 ± 37	132 ± 86	209 ± 117	915 ± 268

S-rats : 感受性群、R-rats : 抵抗性群。各プロットは平均 ± 標準誤差 (SEM) で表した (n = 4)。* は二群間で有意差がある事を示す (Student's *t*-test, $p < 0.05$)。

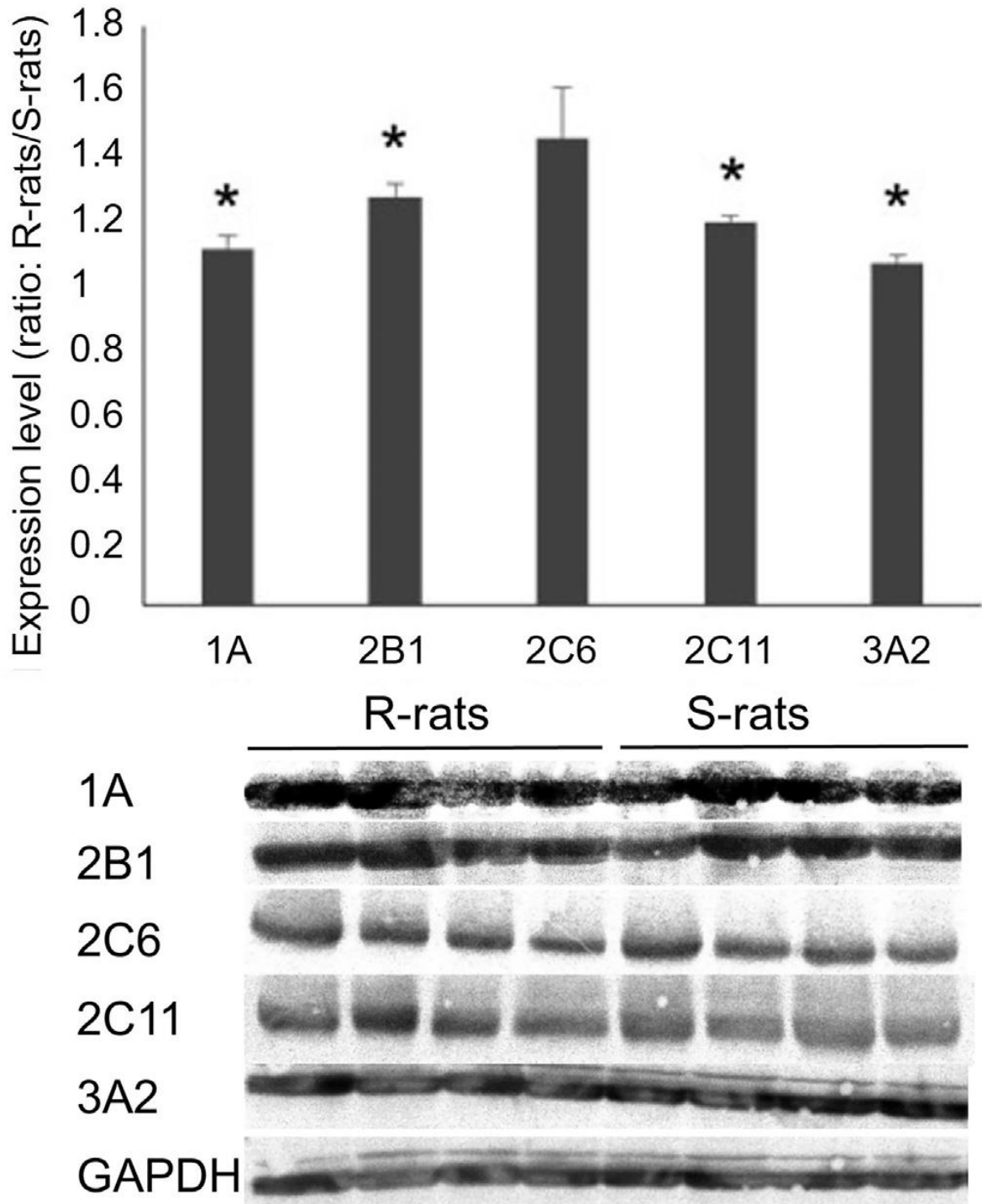


Fig. 3-11：シトクロム P450 のイムノブロッティング。肝ミクロソーム画分を使用したウエスタングロット法によりワルファリン代謝を担う P450 分子種 (CYP-) の発現量を半定量した。ローディングコントロールとして GAPDH を用いた。縦軸は GAPDH による補正值。各値は平均 ± 標準誤差 (SEM) で示した。* は二群間で有意差がある事を示す (Student's t-test, $p < 0.05$)。

— 第四章 —

抵抗性ラットに於けるワルファリン高代謝能の原因分子の同定

背景

第三章では殺鼠剤抵抗性ラットクローズドコロニーを用いた *in vivo* ワルファリン薬物動態学・薬力学的解析と *in situ* ワルファリン肝灌流試験を実施し、本抵抗性群ではワルファリンの体内からの高い排泄能と高い肝代謝能を有している事が明らかとなった。そこで、本章ではこの高代謝能の原因を同定する事を目的とした。ワルファリン代謝は P450 により担われる。一般的に P450 で代謝される化学物質の代謝能が向上する際には代謝を担う P450 のタンパク質発現量が増加している。これに対し第 3 章では 1.2~1.3 倍と比較的軽微な変化を示していた。また、肝灌流試験では、複数の P450 分子種で担われる 5 つの水酸化体全てで一様に高代謝能を示していた事から、高代謝能の原因は各 P450 個別の発現量変化ではなく、全ての P450 分子種に共通する因子が原因である可能性がある。

P450 は酸素を基質とし酸素 1 原子を化学物質へ付与する反応を担うモノオキシゲナーゼ酵素であり、その反応には還元型のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) やニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) と言った電子供与体からの電子伝達を必要とする [88,89] (Fig. 4-1)。これらの電子伝達は外来化学物質代謝を担うミクロソーム中の P450 に対してはシトクロム P450 還元酵素 (CPR) やシトクロム b5 といった酵素により行われる [90,91] (Fig. 4-2)。通常、酸化型の P450 は NADPH を電子供与体として CPR により迅速に還元されるため、NADPH-CPR 系が主要な還元経路だと考えられている。シトクロム b5 と NADH による還元系は単独での酸化型 P450 還元能は低いが、1 電子目が付与された P450 への 2 電子目付与の還元能は高い。また、実験的に CPR と b5 を共存させると相乗作用的に P450 の還元能が増加する事が確認されており、b5 は CPR とのタンパク質相互作用による補助的、エフェクター的な役割を担う可能性があると考えられている [92]。

肝臓中ではペントースリン酸経路 (PP 経路) が電子供与体 NADPH の主要な供給源として機能している [93]。PP 経路は解糖系のグルコース 6 リン酸 (G6P) を起点とする経路で、NADPH 産生を担う不可逆反応の酸化的経路と、3~7 炭糖の相互変換 (可逆反応) によりリボース産生を担う非酸化的経路からなる。NADPH の産生は G6P を基質とするグルコース 6 リン酸脱水素酵素 (G6PD) と、その下流で 6-ホスホグルコン酸を基質とするホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (6PGD) が担う [94] (Fig. 4-3)。この内、PP 経路の反応を開始する G6PD が律速酵素となる事が知られている。

これら CPR や G6PD にも遺伝子変異が生じ遺伝性疾患や薬物代謝に影響を与える事が確認されている。例えば、ヒトでは G6PD の欠損症は鎌状赤血球症の原因となる [95]。本疾患では NADPH の枯渇により酸化ストレスに脆弱になるのが主な病因である。また、乳癌や肝癌等のいくつかの癌細胞では G6PD を含む PP 経路の活性が上昇している。これは癌細胞特有の代謝機構、或いは酸化ストレスへの防御反応であると考えられており、抗癌剤の新たな創薬ターゲットとして注目されつつある [96,97]。ヒトの CPR 遺伝子では 40 種以上の遺伝子多型が報告されており P450 の活性に影響を及ぼす事が確認されているが、その大部分は *in vitro* 試験での P450 活性を低下させる [98,99]。

以上の様に、CPR や G6PD の遺伝子多型も生体に影響を及ぼす事が確認されている。抵抗性群での P450 の活性を理解するには P450 そのものだけではなく、その活性を調節する電子伝達系にも着目する事が必要だと考えられる。本研究では抵抗性群に於ける P450、CPR、G6PD について解析を行った。

方法

動物

ワルファリン抵抗性及び感受性クマネズミコロニー (*Rattus rattus*) はイカリ消毒株式会社から供試された。実験に用いたラットは全てオスであり平均体重は 124.6 ± 15.7 g であった。これらは 12 時間の明暗周期、 $20^{\circ}\text{C} \sim 23^{\circ}\text{C}$ の室温で飼育し、餌 (CE-2、日本クレア)・水は自由摂取とし、実験前の絶食は実施しなかった。

これらに対し、イソフルランの過剰投与による安楽死を行い、その後 5 分以内に肝臓を摘出し液体窒素で凍結させた。凍結肝臓は -80°C で実験に供試するまで保管した。一連の動物実験及び飼育は AAALAC International のガイドラインに従い、北海道大学全学及び大学院獣医学研究院の認証を得て実施した (認証番号 14-0142)。

S9・ミクロソームの調製

P450 が含まれる S9 画分及びミクロソーム画分は上記のラット肝サンプルより調製した [54]。約 3.0 g の肝臓を 9.0 mL の氷冷 0.1 M リン酸カリウムバッファー (KPB、pH 7.4) でホモジナイズした。ホモジナイズ液は 4°C 、 $9,000 \times g$ で 20 分間遠心した。この上清をガーゼで濾し、もう一度同条件で遠心した上清を S9 画分とし、液体窒素で凍結させた。また、この S9 画分の一部はミクロソーム調製用に 4°C 、 $105,000 \times g$ で 60 分間超遠心した。遠心後のペレットを 0.1 M KPB に溶解しミクロソーム画分とし、液体窒素で凍結させ使用時まで -80°C で保管した。これらのタンパク質濃度は Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で測定した [55]。ま

た、ミクロソーム画分中の P450 含有量は大村らの手法に従い測定した [54]。

ミクロソーム画分を用いたワルファリン代謝活性試験

肝ミクロソーム画分に含まれる P450 によるワルファリンの水酸化代謝活性を酵素速度論的に解析した [30,100]。肝ミクロソーム (1 mg/mL)、G6P (5 mM、富士フィルム和光純薬株式会社、大阪)、塩化マグネシウム (MgCl_2 , 3 mM、富士フィルム和光純薬株式会社)、ワルファリンナトリウム (10、25、50、100、200、400、800 μM) いずれも終濃度を含む反応液を調製した。これらは 37°C で 5 分間恒温振盪槽にてプレインキュベートした。その後、反応開始液として G6PD (2 IU/mL、富士フィルム和光純薬) と β -NADPH (0.5 mM、富士フィルム和光純薬) 各終濃度を添加した。反応液の容量は 100 μL とした。10 分間の反応の後、氷冷メタノールを 1 mL 添加後激しくボルテックスを行い、反応を停止させた。これを 15,000 \times g で 10 分間遠心してタンパク質を沈殿させ、上清を 150 μL 回収し分析に供試した。反応液中の各水酸化ワルファリンは第 3 章と同様の分析条件で HPLC-ESI-MS/MS で検出・定量した。

S9 画分を用いたワルファリン代謝活性試験

S9 画分を用いて、内因性 G6PD 産生 NADPH 依存性のワルファリン代謝活性試験を実施した。肝 S9 (1 mg/mL)、G6P (5 mM)、 MgCl_2 (3 mM)、ワルファリンナトリウム (10、25、50、100、200、400、800 μM) いずれも終濃度、を含む反応液を調製した (合計 100 μL)。これらを 37°C、5 分間恒温振盪槽にてプレインキュベートした。その後、酸化型 β -NADP⁺ (0.5 mM) を添加し反応を開始した。10 分間の反応後、氷冷メタノールを 1 mL 添加し反応を停止させた。これを 15,000 \times g で 10 分間遠心し、上清 150 μL を回収し HPLC-ESI-MS/MS での分析に供試した。

シトクロム P450 還元酵素の活性試験

CPR 活性についても大村と竹末の方法を一部改変し、ミクロソーム画分と S9 画分の双方で測定した [101]。KPB (0.1 M、pH 7.4) と 50 μM シトクロム c (ウシ心臓由来、Sigma Aldrich) とミクロソーム画分または S9 画分 (各 1 mg/mL) を含む反応液を調製した。これに反応開始液としてミクロソームには 0.5 mM の β -NADPH と 2 IU/mL の G6PD を、S9 画分には β -NADP⁺ (0.5 mM) をそれぞれ添加した。シトクロム c の還元反応を 550 nm の吸光波長の変化として吸光光度計 (UV-2600、島津製作所) で 1 分間経時的に測定した。また、CPR 以外の還元酵素によるシトクロム c 還元能は CPR 活性阻害物質である Diphenyleneiodonium chloride (和光純薬株式会社) を終濃度 1mM 添加して測定し、補正した [102]。

PP 経路活性

肝臓中の主要な NADPH 供給源となる PP 経路での NADPH 産生活性は S9 画分を用いて測定した [103]。反応液として肝 S9 (1 mg/mL)、G6P (5 mM)、MgCl₂ (3 mM) を調製した。これに β -NADP⁺ (0.5 mM) を添加し反応を開始した。G6PD または 6PGD で生成される NADPH を 340 nm の吸光波長で 1 分間経時的に観察しその速度を測定した。

ウェスタンブロット

ミクロソーム中の G6PD 及び 6PGD タンパク質発現量はウェスタンブロット法にて半定量した。S9 画分を 10%ポリアクリルアミドゲルに 10 μ g/lane アプライし SDS-PAGE を行った。その後、タンパク質を 0.2 μ m PVDF メンブレンにセミドライ法にて転写した。ブロッキングはプロテインフリーブロッキングバッファー (タカラバイオ) 中で室温、1 時間実施した。一次抗体は anti-G6PD 抗体、anti-6PGD 抗体、ローディングコントロールとして anti- β actin 抗体を用い、二次抗体は HRP 標識 anti-マウス IgG 抗体 (いずれも Abcam) を用いた。検出は Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

シーケンス解析

抵抗性群と感受性群の *G6pd* 遺伝子のコーディング領域配列 (CDS) を比較した。mRNA は各肝サンプルから NucleoSpin RNA (タカラバイオ) でメーカーの標準的プロトコルに従い抽出した。mRNA からの相補的 DNA (cDNA) 合成は ReverTra Ace (東洋紡、大阪) を用いて行った。*G6pd* の CDS を含む領域を PrimeSTAR MAX DNA Polymerase (タカラバイオ株式会社、滋賀) を用いての cDNA をテンプレートとした PCR で増幅した。PCR は 94 °C/5 秒、60 °C/5 秒、72 °C/15 秒、35 サイクルの条件で実施した。本 PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN N.V., Hilden, Germany) で精製した後に、シーケンス解析に供試した (株式会社ファスマック)。遺伝子のアライメント解析は MEGA7 を用いた [53]。上記の試験系で用いたプライマーの配列情報は Table 4-1 に記載した。

統計

ワルファリン代謝活性試験で得た代謝活性値はミカエリス・メンテン式に非線形回帰し、 V_{max} 、 K_m 、 V_{max}/K_m を GraphPad Prism 8 software で算出した (GraphPad Software Inc.)。抵抗性群と感受性群間の検定は Student *t*-test で有意水準 $p < 0.05$ で実施した (JMP 14, SAS Institute)。

結果

P450 濃度

ミクロソーム画分中、S9 画分中に含まれる総 P450 濃度を 450 nm の吸収スペクトルで測定した。ミクロソーム画分では抵抗性群が 0.987 ± 0.100 nmol/mg protein であり、感受性群が 0.784 ± 0.03 nmol/mg protein と抵抗性群の方が高い傾向を示したが有意差は認められなかった ($p = 0.0508$)。S9 画分でも、抵抗性群が 0.183 ± 0.017 nmol/mg protein であり、感受性群が 0.208 ± 0.014 nmol/mg protein と有意差は認められなかった。

ワルファリン代謝活性 (ミクロソーム)

ワルファリン代謝活性について、ミクロソーム画分に複数の基質濃度を添加し酵素速度論的解析を行った (Fig. 4-4)。ミクロソーム画分には P450 と CPR が含まれており、電子伝達系を再現するために電子供与体となる NADPH とそのリサイクルを担う酵素である G6PD を反応開始液として添加した。抵抗性群、感受性群共に 800 μ M までのワルファリン濃度で 4'-、6-、7-、10-OH ワルファリンの 4 つの水酸化体で良好なミカエリス・メンテンプロットへの回帰を示した。一方、8-OH 体については 100 μ M を頂点として、その後代謝速度が減少していく所謂基質阻害が生じている事を示唆する動態を示した。この非線形回帰から算出した酵素速度論的パラメーターは Table 4-2 に示した。 V_{max} を比較すると、抵抗性群では感受性群と比較し 7-OH 体以外の 4 つの水酸化体で有意に高い値を示した。生理的基質濃度での代謝能の指標となる酵素効率 (V_{max}/K_m) では、4'-、7-、8-OH の 3 つの水酸化体で 1.3~2.6 倍程度有意に高い値を示したが、6-OH 体では抵抗性群の方が有意に低く、また、10-OH 体では二群間に有意差は認められなかった。

ワルファリン代謝活性 (S9)

一般的なミクロソーム画分を用いた P450 代謝活性試験では P450 の反応に必要な電子供与体 NADPH を試薬として添加するが、内因性の NADPH 産生能がワルファリン代謝に与える影響を観察するために S9 画分を用いる手法に改変した。本法では NADPH 産生経路である PP 経路も含む S9 画分に NADP⁺ を添加する事で内因性 NADPH 産生能依存性のワルファリン代謝活性試験を行った (Fig. 4-5)。その結果、抵抗性群は 4'-、6-、7-、8-OH 体で有意に高い V_{max} を示し、 V_{max}/K_m を比較すると同様に 4 つの水酸化体で 3.2~4.8 倍程度有意に高い活性を示した (Table. 4-3)。

シトクロム P450 還元酵素 (CPR) 活性

CPR によるシトクロム P450 の還元反応は P450 の活性に不可欠な要素であるため、

ミクロソーム画分と S9 画分の双方で CPR 活性を測定した。肝ミクロソーム画分に於ける CPR 依存性のシトクロム c 還元活性では抵抗性群と感受性群の 2 群間に有意差は認められなかった (Fig. 4-6: A)。一方、S9 画分では抵抗性群が感受性群と比較し有意に高い還元活性を示した (Fig. 4-6: B)。

ペントースリン酸経路 (PP 経路) 活性

肝臓中での主要な NADPH 供給源である PP 経路での NADPH 産生活性を、肝 S9 画分を用い測定した。PP 経路では 1 分子の G6P を起点として、G6PD とその下流酵素の 6 PGD により 2 分子の NADP⁺が NADPH へ還元される。本試験系では G6P と NADP⁺を基質として添加する事でこの反応を再現した (Fig. 4-7)。その結果、抵抗性群では感受性群よりも有意に高い NADPH 産生活性を示した。

G6PD の遺伝子シーケンス解析

上記の *in vitro* 試験系で確認された高 NADPH 産生能の原因を同定するために NADPH 産生の律速酵素である G6PD について CDS を抵抗性群と感受性群で比較した。その結果、抵抗性群と感受性群の間では G6PD の CDS 配列上の違いは認められなかった (data not shown)。

G6PD・6 PGD のタンパク質発現量解析

G6PD と 6 PGD について、肝 S9 中に於けるタンパク質発現量を β -actin を内在性コントロールとするウェスタンブロット法で解析した。その結果、G6PD について有意差は認められなかったが、6 PGD については感受性群の方が有意に高い発現量を示した (Fig. 4-8)。

考察

第 4 章では、先章の *in vivo* 薬物動態学的解析と *in situ* 肝灌流試験で観察された高代謝能の原因を探索するために、シトクロム P450 とその活性に関与する電子伝達系に着目した解析を行った。その結果、肝臓から抽出した P450 を含む酵素画分であるミクロソームを用いたワルファリン代謝活性試験では抵抗性群は 4'-、7-、8-OH の 3 つの水酸化体で感受性群と比較して有意に高い代謝活性 (V_{max}/K_m) を示したが、6-OH 体では抵抗性群の方が有意に低く、10-OH 体では有意差は認められず、4'-、7-、8-OH でも肝灌流試験での代謝能よりも軽微な変化であった (Fig. 4-9)。 *in situ* 肝灌流試験とミクロソーム画分での *in vitro* 試験での条件の差として電子伝達系に着目し S9 画分を用いた *in vitro* 試験を実施した。 *In situ* 肝灌流試験では細胞内の NADPH 産生能に依存した P450 代謝が行われているが、ミクロソーム画分ではそれを担う酵素 G6PD

を試薬として添加し、外因性の NADPH 産生能に依存し純粋な P450 活性を測定しているためである。*In vitro* 試験で内因性の NADPH 産生能依存性 P450 活性を再現するために G6PD を含む S9 画分に NADP⁺を添加した。その結果、抵抗性群は感受性群と比較し有意に高い代謝活性を示し、その程度もミクロソーム画分を用いた試験系よりも大きく、生体で見られた抵抗性群の高代謝能の原因は P450 自体の影響よりも NADPH 産生能に起因する事が示唆された。

そこで、肝 S9 画分を用いて肝 NADPH 産生能を測定した所、実際に抵抗性群が感受性群よりも有意に高い NADPH 産生活性を有している事が確認された (Fig. 4-6)。NADPH を電子供与体とした P450 の還元反応を行う酵素である CPR 活性についても測定した所、ミクロソーム画分を用いた *in vitro* 試験では抵抗性群と感受性群の間に有意差は認められなかったが、S9 画分を用いた内因性 NADPH 産生能依存性の CPR 活性を測定すると抵抗性群は有意に高い CPR 活性を示した (Fig. 4-7)。以上から、抵抗性群では PP 経路による NADPH 産生能が高く、これにより NADPH を電子供与体とする CPR、P450 の高代謝能を得ている事が示唆された。PP 経路では 1 分子の G6P を起点として、G6PD とその下流酵素の 6 PGD により 2 分子の NADP⁺が NADPH へ還元される (Fig. 4-3)。高 NADPH 産生能の原因を同定するために G6PD と 6PGD それぞれの遺伝子配列とタンパク質発現量を解析した所、G6PD の遺伝子配列には両群で違いはなく、タンパク質発現量についても抵抗性群はこれらの酵素で高い発現量を示さなかった。つまり、高 NADPH 産生能の原因は遺伝子変異による酵素の構造の変化やタンパク質発現量の増加に由る物では無い事が示唆された。

本研究ではミクロソーム、S9 といった酵素画分を用いた *in vitro* での酵素反応の再現系を利用し各酵素の解析を行った。これらは生体・細胞内とは異なる環境であるため、その結果の解釈に留意する必要がある。今回 P450 による酵素速度論的解析をミクロソーム画分と S9 画分で実施したが、同じ水酸化体に於いてもミクロソーム画分の方が S9 画分よりも高い代謝活性を示している。これは S9 画分では反応開始液添加時点では反応に必要な NADPH が存在しないのに対し、ミクロソーム画分では反応開始時点で 0.5 mM と十分量の NADPH が存在するという NADPH 濃度の違い、或いは含有 P450 量の差に起因する物だと考えられる。また、各画分内の生体由来 NADPH に関しては、試薬の NADPH/NADP⁺非添加時にはワルファリン代謝が検出できない事から実験系への影響は無視できると考えられる。なお、S9 画分内の生体由来 NADPH/NADP⁺濃度自体も Abcam NADP/NADPH Assay Kit での測定を試みたが、検出限界以下であった (data not shown)。また、NADPH 産生能について、*in vitro* の PP 経路活性では抵抗性群が高活性を示したが PP 経路の NADPH 産生酵素の配列・発現量に変化が無かった事から高活性の原因は不透明である。生体内では PP 経路の他に

もリンゴ酸脱水素酵素等でも NADPH が産生される事が知られているが、本試験系では基質としてグルコース 6 リン酸を添加しており、酵素の基質特異性を鑑みると PP 経路以外の酵素の関与の可能性は低いと考えられる。また、NADPH 産生を担う酵素のうち、酸化ストレス等外来性の NADPH 要求量の高まりに対しては PP 経路が最も反応性が高い事も知られている [104]。

G6PD・6 PGD の遺伝子変異、タンパク質発現量増加以外の高活性を齎す要因として、PP 経路の律速酵素 G6PD の翻訳後修飾・活性調節機構の変化が挙げられる。PP 経路は NADPH 産生を主目的とする酸化的経路とリボース 5 リン酸 (R5P) 産生を主目的とする非酸化的経路の 2 つから構成される。PP 経路では、臓器内に於ける NADPH と R5P それぞれの需要のバランスに基づいて、中間代謝物のグリセルアルデヒド 3 リン酸やフルクトース 6 リン酸の可逆的な変換を介して酸化的経路・非酸化的経路それぞれを特異的に活性化する事が知られている。このような細かな活性調節が必要なためか G6PD は複数の機構によりタンパク質発現量の変化を介さない、所謂翻訳後修飾・活性調節を受ける事が明らかになりつつある (Fig. 4-10)。G6PD はダイマーで活性を持つ酵素であるが、癌抑制遺伝子として知られる p53 は G6PD と直接結合する事でダイマー形成を阻止し活性を抑制する [105,106]。また、G6PD のダイマー形成はその 403 番目のリシンのアセチル化により抑制される。このため、このアセチル化反応を担う KAT9 は G6PD のサプレッサーとして働き、脱アセチル化を担う SIRT2 はアクチベーターとして機能する [107]。加えて、熱ショックタンパク質 HSP27 は SIRT2 と G6PD の結合性を増強する事で G6PD の活性化を担う事が明らかになった [108]。アセチル化に加えて、G6PD に対する O-結合型 β -N-アセチルグルコサミン付加 (O-GlcNAc 化) は G6PD を活性化する事も判明した [109]。このように、G6PD は複数の機構で活性の調節を受ける酵素であり、実際にいくつかの癌細胞ではこれらの機序の活性化/抑制を介し、PP 経路の高活性を維持する事が知られている [96]。今回の試験系で確認された抵抗性群での高 PP 経路活性もこれらの経路の変化により生じている可能性があり、更なるメカニズム解明のためには抵抗性群に於けるこれらの要素についても検討する必要がある。

本研究から、東京にて高頻度で確認される Leu76Pro 変異 VKOR を持つ抵抗性群のクローズドコロニーでは高 NADPH 産生活性と P450 によるワルファリン代謝活性を併せ持つ事が明らかとなった。本研究はクローズドコロニーを用いての実験的な証明に注視したが、本表現型の野生抵抗性個体群での保有状況についてはフィールド調査により明らかにする必要がある。また、哺乳類では G6PD の遺伝子は X 染色体上にコードされている。本研究では雄に着目し抵抗性群と感受性群の比較を行ったが、本表現型について雌でも解析を行う事が求められる。今後の展望として、本研究で得た

知見の新規殺鼠剤開発への応用が期待される。石塚らは東京の抵抗性ラットに対して、P450 阻害剤である SKF-525A とワルファリンの共摂取が致死効果を示す事を示した [32]。本知見は代謝の阻害は一定程度ワルファリンの毒性を増強できる事を示している。また、癌で高 PP 経路活性が確認されている事から G6PD の阻害は抗癌剤のターゲットとして注目を集めつつある。G6PD の阻害剤であるデヒドロエピアンドロステロンは癌細胞の成長性を低下させると報告されている他、2-デオキシ-D-グルコースや 6-アミノニコチンアミド等も G6PD の阻害を通してグリオーマや扁平上皮癌細胞の放射線感受性を増加させる事が確認されている [110–112]。以上から、G6PD の阻害や P450、CPR の阻害と既存の殺鼠剤を組み合わせる事で抵抗性齧歯類にも有効な殺鼠剤となる事が期待される。

小括

本研究により、抵抗性群では肝 S9 画分中の PP 経路を介した高い NADPH 産生活性を有している事が判明した。そして、生体で確認された高ワルファリン代謝能はシトクロム P450 自体の要因よりも高 NADPH 産生能依存性に得ている事が示唆された。一方、肝臓中での NADPH 産生を担う主要な酵素である G6PD、6PGD の遺伝子配列・タンパク質発現量には変化はなく、高 NADPH 産生能の原因は G6PD の翻訳後修飾の変化である可能性が考えられる。今後、更なる詳細なメカニズムの解析と PP 経路、P450 に着目した新規殺鼠剤の開発が期待される。

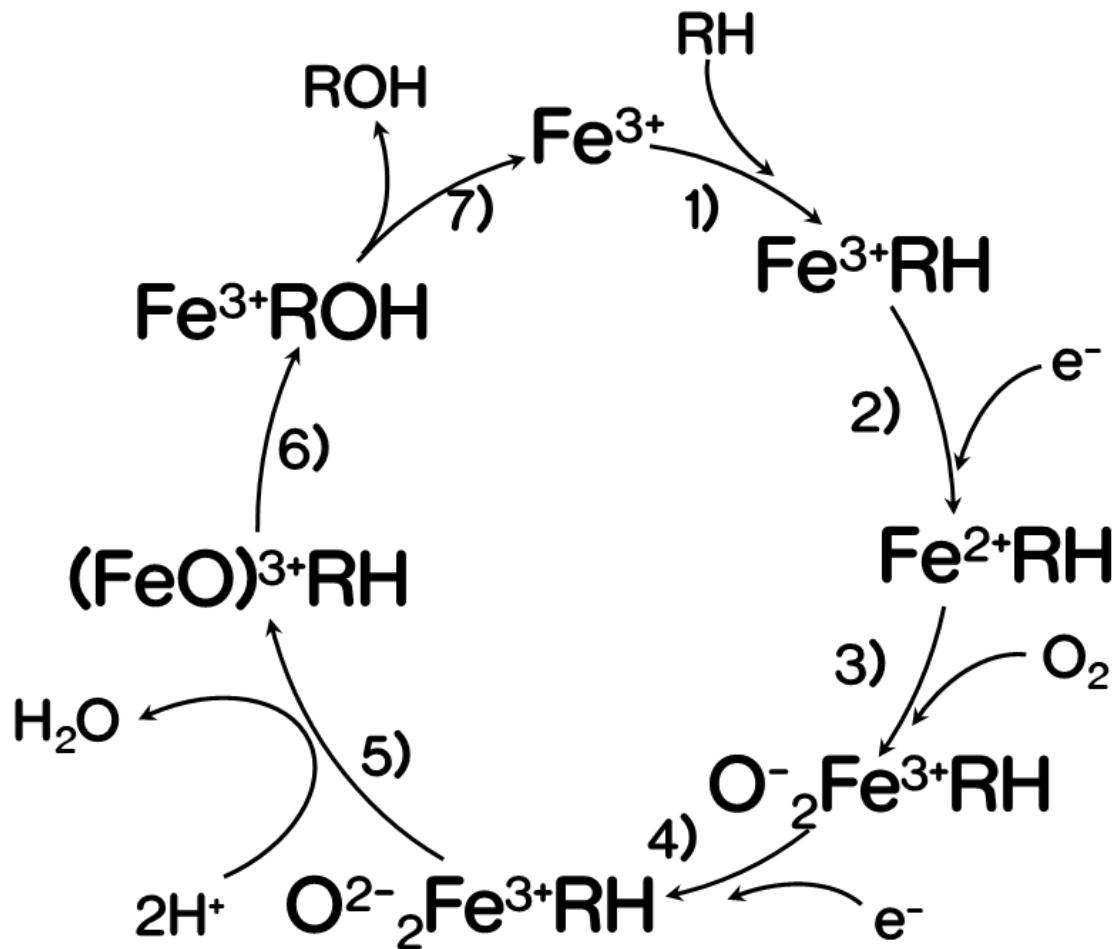


Fig. 4-1: シトクロム P450 の酸素添加反応機構、Coon/2002 年より改変 [113]。P450 の反応機構として 1971 年に Estabrook らにより P450 の活性中心であるへム鉄の酸化還元状態に着目した cyclic reaction mechanism が提唱された [89]。(1) 酸化型 P450 に基質 (RH) が結合 (2) P450 の活性中心であるへム鉄が 1 電子導入により還元 (3) へム鉄に酸素が結合 (4) 2 つ目の電子導入で酸素が活性化 (5) プロトンの導入により酸素分子が開裂 (6) 基質への酸素添加反応が起こる。(7) 水酸化された基質 (ROH) が脱離し元の酸化型 P450 へ戻る。

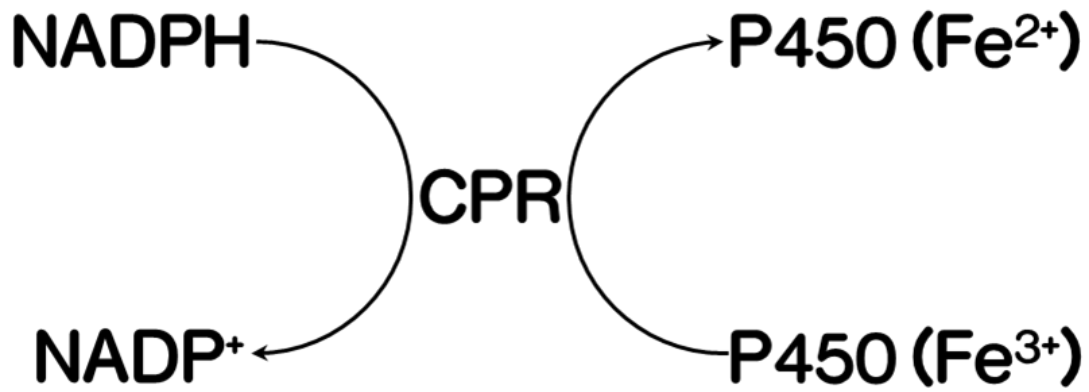


Fig. 4-2 : NADPH からの P450 への電子伝達経路、Coon/2002 年より改変 [113]。酸化型シトクロム P450 はその酸素添加反応を行う際に、シトクロム P450 還元酵素(CPR) からニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソ酸 (NADPH) を電子供与源とした還元反応を受ける。この反応により NADPH は酸化型 (NADP⁺) へ変換される。

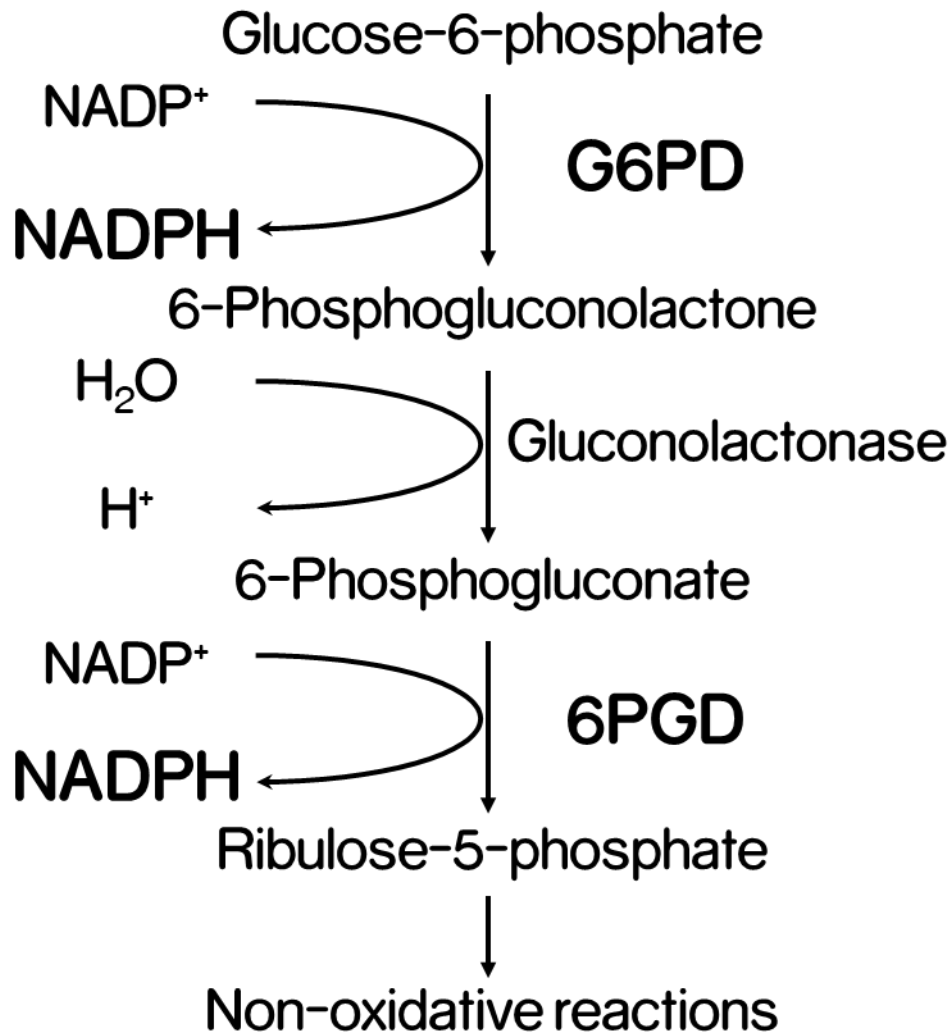


Fig. 4-3 : ペントースリン酸経路の酸化的経路。1分子のグルコース6リン酸を起点として2分子のNADPHが産生される。NADPH産生はグルコース6リン酸脱水素酵素（G6PD）とホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ（6PGD）という2つの酵素により担われる。酸化的経路の最終生成物であるリブローズ5リン酸から下流は3~7炭糖の相互変換（可逆反応）を行う非酸化的経路に移行する。

Table 4-1 : ラット *G6pd* シーケンス解析プライマー配列

rat_G6PD_F1	AAAGCACACGCCCTCTTGCG
rat_G6PD_R1700	GATGCAGAAAGGGTGGCCAGAAG
rat_G6PD_422F	GCCCGTAACTCCTATGTAGC
rat_G6PD_901F	CCACCTCCTGCAGATGTTGTG
rat_G6PD_1681R	GGCCAGAAGAGGCAGAGTGCAGATG
rat_G6PD_20F	GTAAATGGGCCAACGAAGCTTAG

本研究で用いた抵抗性群、感受性群クマネズミのグルコース 6 リン酸脱水素酵素 (*G6pd*) のコーディング領域 (CDS) を解読する際に用いたプライマーセット。CDS 全長のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を mRNA から逆転写した相補的 DNA (cDNA) を鋳型とし、rat_G6PD_F1 と rat_G6PD_R1700 の 2 つのプライマーを用いて行った後に、CDS 全長を各プライマーで解読した。

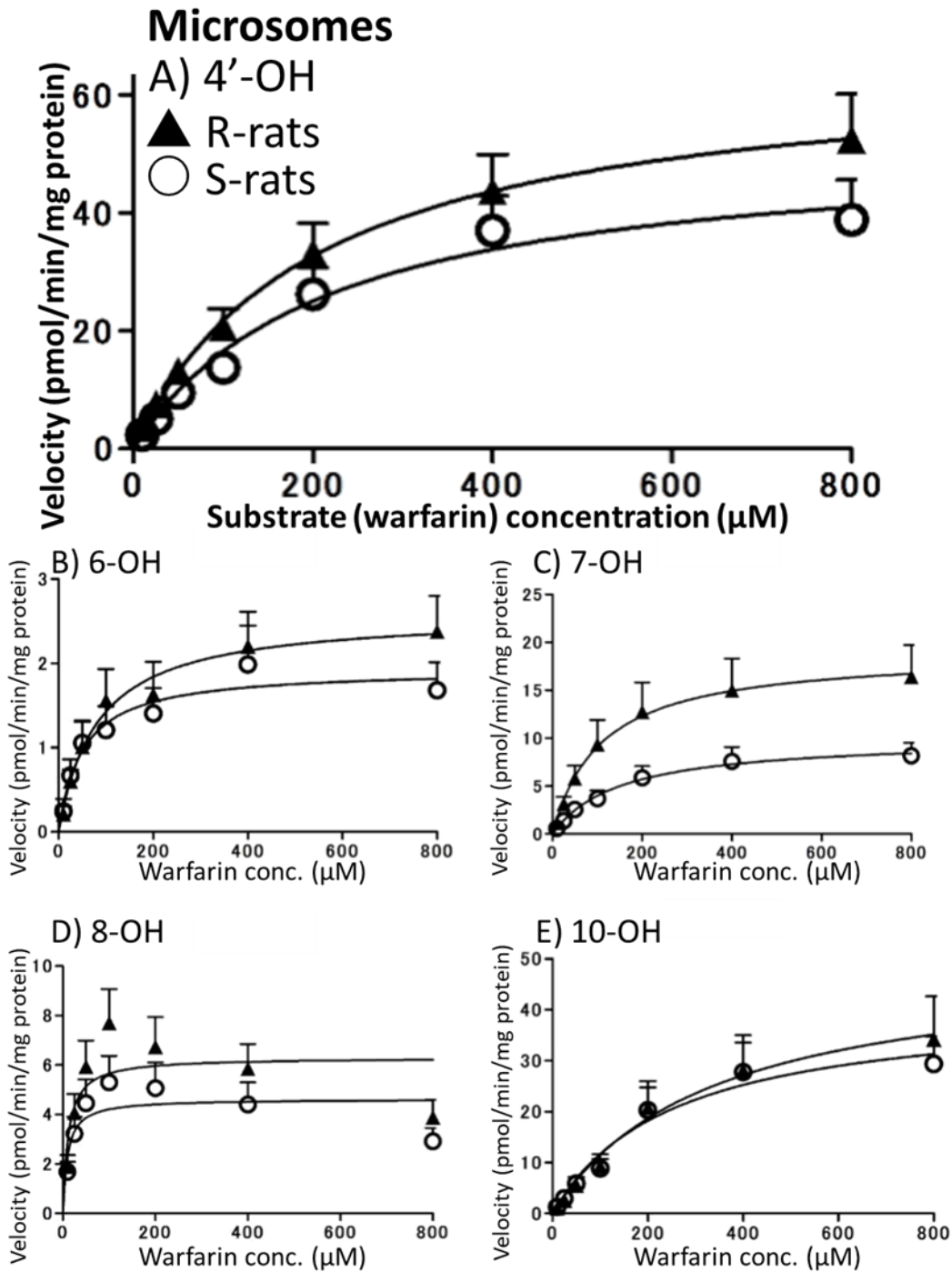


Fig. 4-4：ワルファリン代謝活性のミカエリス・メンテンプロット（ミクロソーム）。ミクロソーム画分を用い測定したワルファリン水酸化代謝活性をミカエリス・メンテン式に非線形回帰した。各プロットは平均 ± 標準誤差（SEM）で示した（n=4）。本回帰曲線で取得した酵素速度論的パラメーターは Table 4-2 に示した。○：感受性群（S-rats）、▲：抵抗性群（R-rats）。

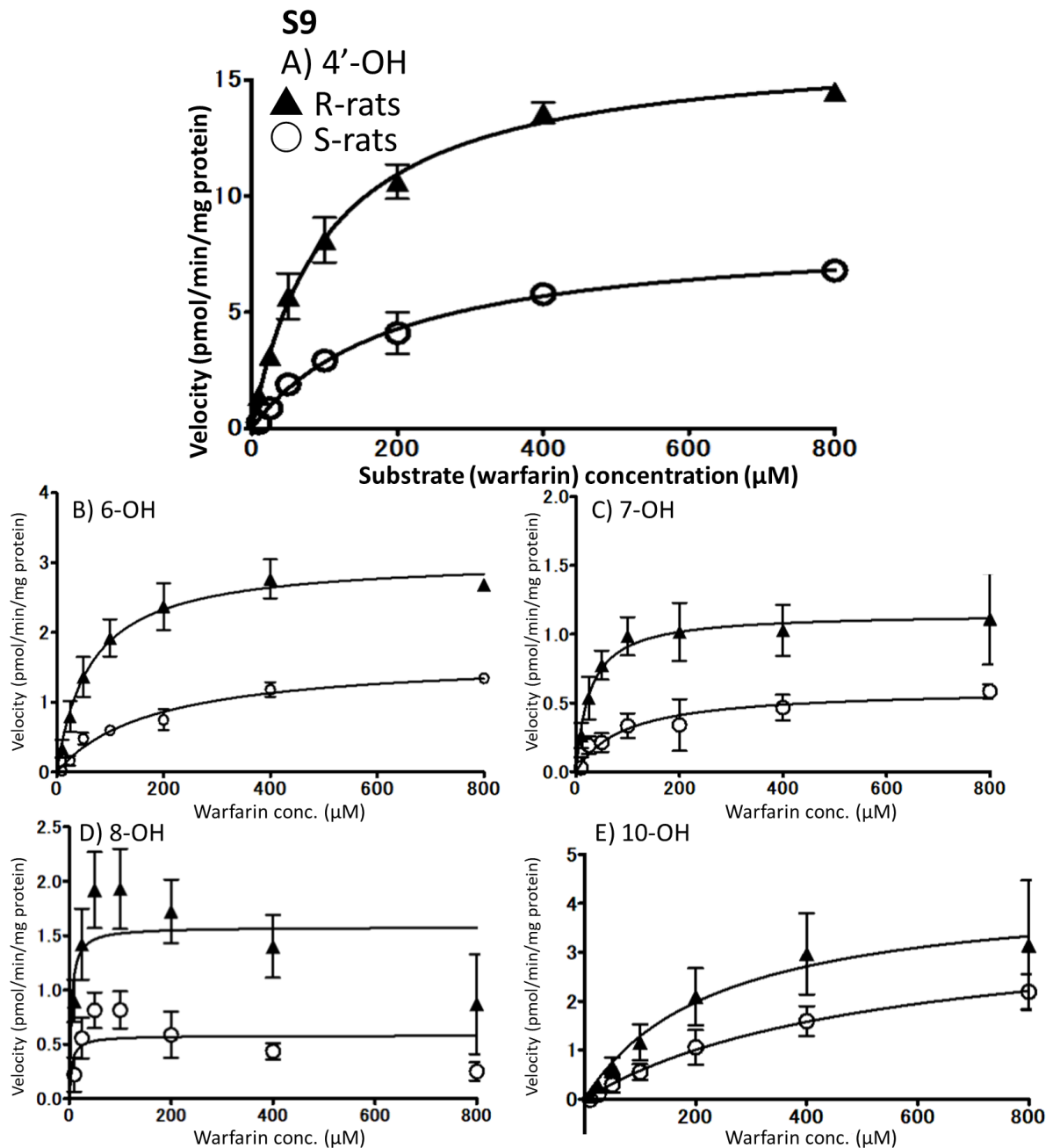


Fig. 4-5：ワルファリン代謝活性のミカエリス・メンテンプロット (S9)。S9 画分に NADP^+ を添加する事で、内因性の NADPH 産生能に依存したワルファリン水酸化代謝活性を測定した。各ワルファリン代謝活性はミカエリス・メンテン式に非線形回帰し酵素速度論的パラメーターを算出した (Table 4-3)。各プロットは平均 \pm 標準誤差 (SEM) で示した ($n=4$)。○：感受性群 (S-rats)、▲：抵抗性群 (R-rats)。

Table 4-2 : ワルファリン代謝活性の酵素速度論的パラメーター (ミクロソーム)

4'-OH	R-rats	S-rats
V_{max} (pmol/mg protein /min)	66.5±9.5*	56.7±7.7
K_m (μM)	199.8±28.4	270.6±44.6
V_{max}/K_m	0.33±0.05*	0.25±0.06
6-OH		
V_{max} (pmol/mg protein /min)	2.63±0.45*	2.29±0.37
K_m (μM)	96.6±18.9	140.9±116.9
V_{max}/K_m	0.034±0.011*	0.058±0.019
7-OH		
V_{max} (pmol/mg protein /min)	19.5±3.8	10.9±1.6
K_m (μM)	136.0±23.2	219.0±58.4
V_{max}/K_m	0.180±0.05*	0.068±0.018
8-OH		
V_{max} (pmol/mg protein /min)	6.33±1.11*	4.78±1.00
K_m (μM)	11.0±1.8*	10.8±1.4
V_{max}/K_m	0.60±0.14*	0.45±0.10
10-OH		
V_{max} (pmol/mg protein /min)	50.1±12.0*	46.7±9.2
K_m (μM)	320.1±33.1	310.3±41.6
V_{max}/K_m	0.15±0.04	0.16±0.04

ミクロソーム画分を用いた際のワルファリン水酸化代謝活性の酵素速度論的パラメーターを示している。R-rats : 抵抗性群、S-rats : 感受性群。 V_{max} : 最大反応速度、 K_m : 反応速度が $V_{max}/2$ になる際の基質 (ワルファリン) 濃度、 V_{max}/K_m : 酵素効率。各値は平均 ± 標準誤差 (SEM) で示し、* は二群間で有意差がある事を示す (Student's *t*-test, $p < 0.05$)。

Table 4-3 ワルファリン代謝活性の酵素速度論的パラメーター (S9)

	R-rats	S-rats
4'-OH		
V_{max} (pmol/mg protein /min)	16.96±0.42*	8.56±0.23
K_m (μM)	115±31	218±55
V_{max}/K_m	0.166±0.036*	0.046±0.014
6-OH		
V_{max} (pmol/mg protein /min)	3.27±0.25*	1.48±0.24
K_m (μM)	78.5±14.2	147±45
V_{max}/K_m	0.047±0.013*	0.011±0.002
7-OH		
V_{max} (pmol/mg protein /min)	1.16±0.21*	0.59±0.04
K_m (μM)	28.4±2.71	123±75
V_{max}/K_m	0.042±0.001*	0.013±0.002
8-OH		
V_{max} (pmol/mg protein /min)	1.68±0.35*	0.609±0.09
K_m (μM)	5.35±2.22	9.66±3.26
V_{max}/K_m	0.382±0.105*	0.078±0.029
10-OH		
V_{max} (pmol/mg protein /min)	5.73±1.85	3.04±0.32
K_m (μM)	353.±50.3	348±68.1
V_{max}/K_m	0.016±0.004	0.009±0.002

S9 画分を用いた際のワルファリン水酸化代謝活性の酵素速度論的パラメーターを示している。R-rats：抵抗性群、S-rats：感受性群。 V_{max} ：最大反応速度、 K_m ：反応速度が $V_{max}/2$ になる際の基質（ワルファリン）濃度、 V_{max}/K_m ：酵素効率。各値は平均 ± 標準誤差 (SEM) で示し、* は二群間で有意差がある事を示す (n = 4, Student's *t*-test, $p < 0.05$)。

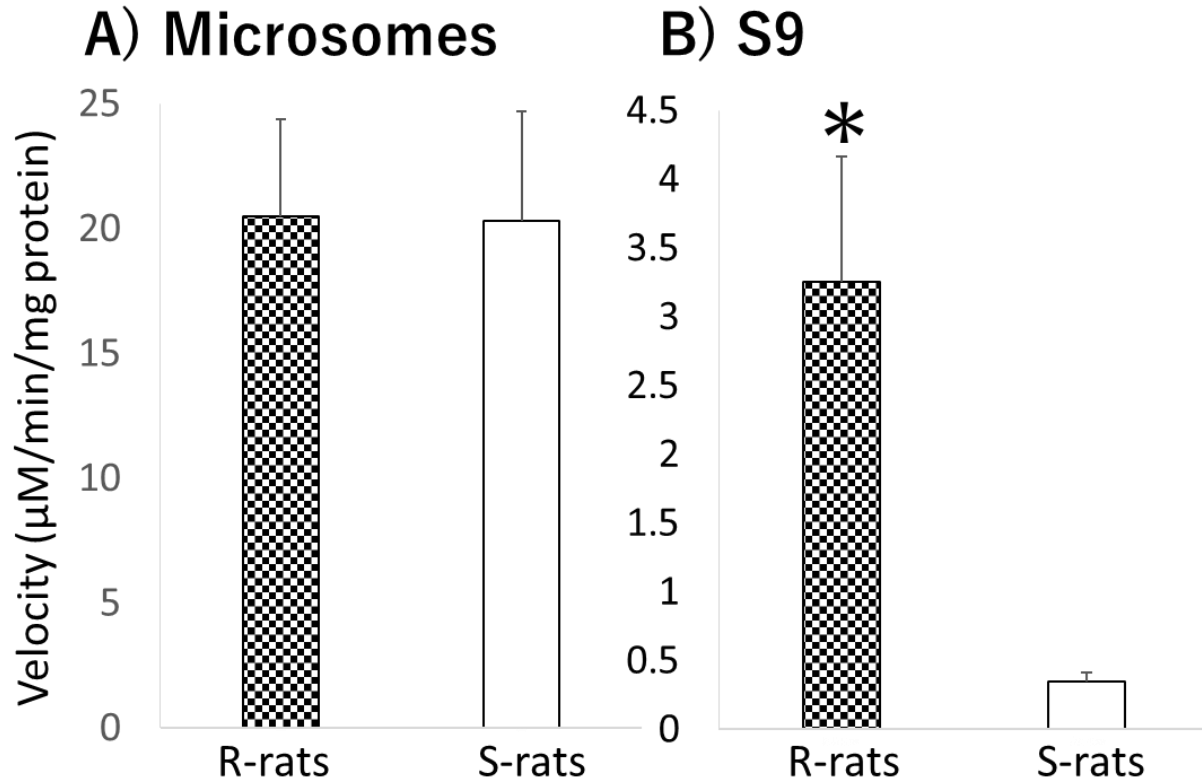


Fig. 4-6：シトクロム P450 還元酵素（CPR）活性。CPR 依存性のシトクロム c 還元速度を測定した。R-rats：抵抗性群、S-rats：感受性群。A) ミクロソーム画分に反応開始液として NADPH と G6PD を添加した。B) S9 画分に NADP^+ を添加した。各値は平均 \pm 標準誤差 (SEM) で示し、* は二群間で有意差がある事を示す ($n=4$, Student's t -test, $p < 0.05$)。

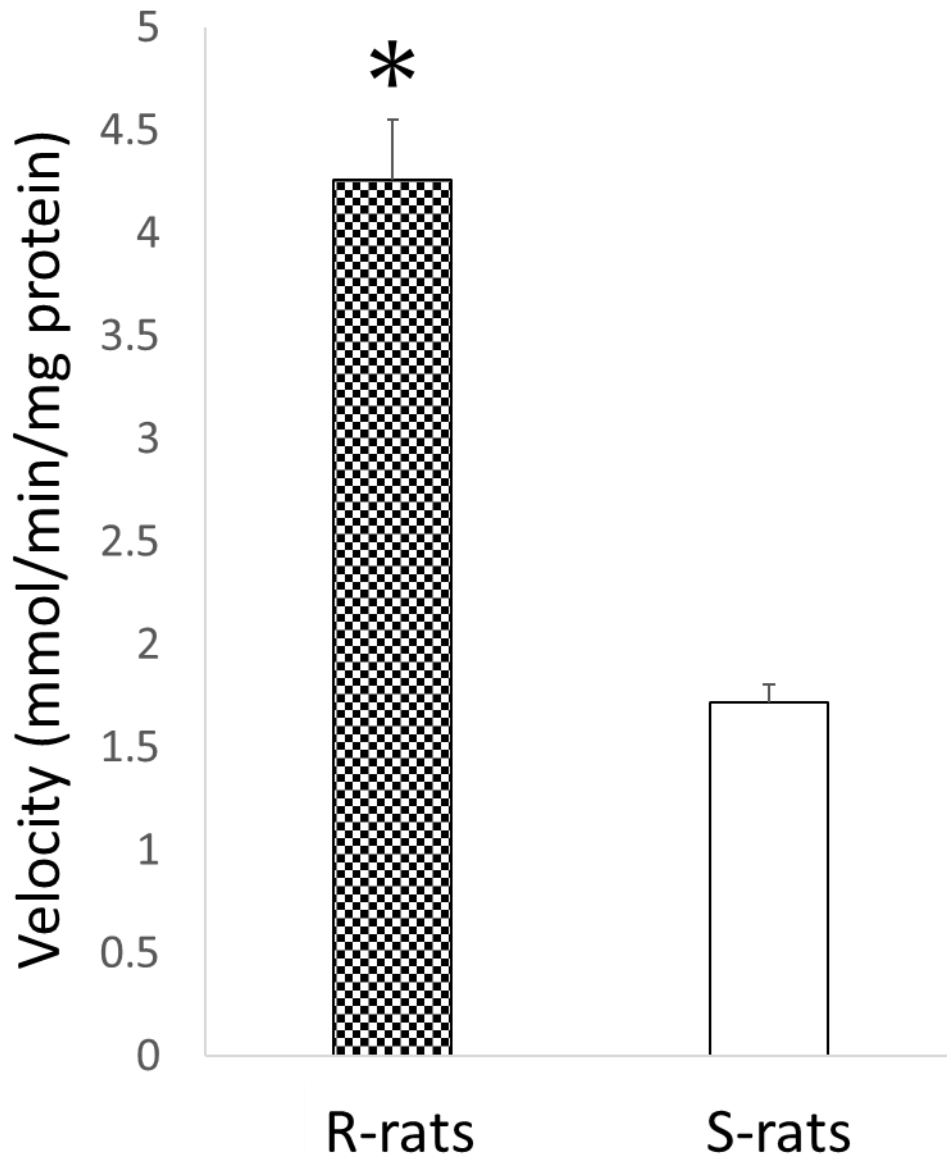


Fig. 4-7: ペントースリン酸 (PP) 経路による NADPH 産生活性。PP 経路に含まれる NADPH 産生酵素であるグルコース 6 リン酸脱水素酵素 (G6PD) 及びホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (6PGD) による NADPH 産生速度を S9 画分を用いた *in vitro* 試験で測定した。R-rats: 抵抗性群、S-rats: 感受性群。各値は平均 \pm 標準誤差 (SEM) で示し、* は二群間で有意差がある事を示す ($n = 4$, Student's *t*-test, $p < 0.05$)。

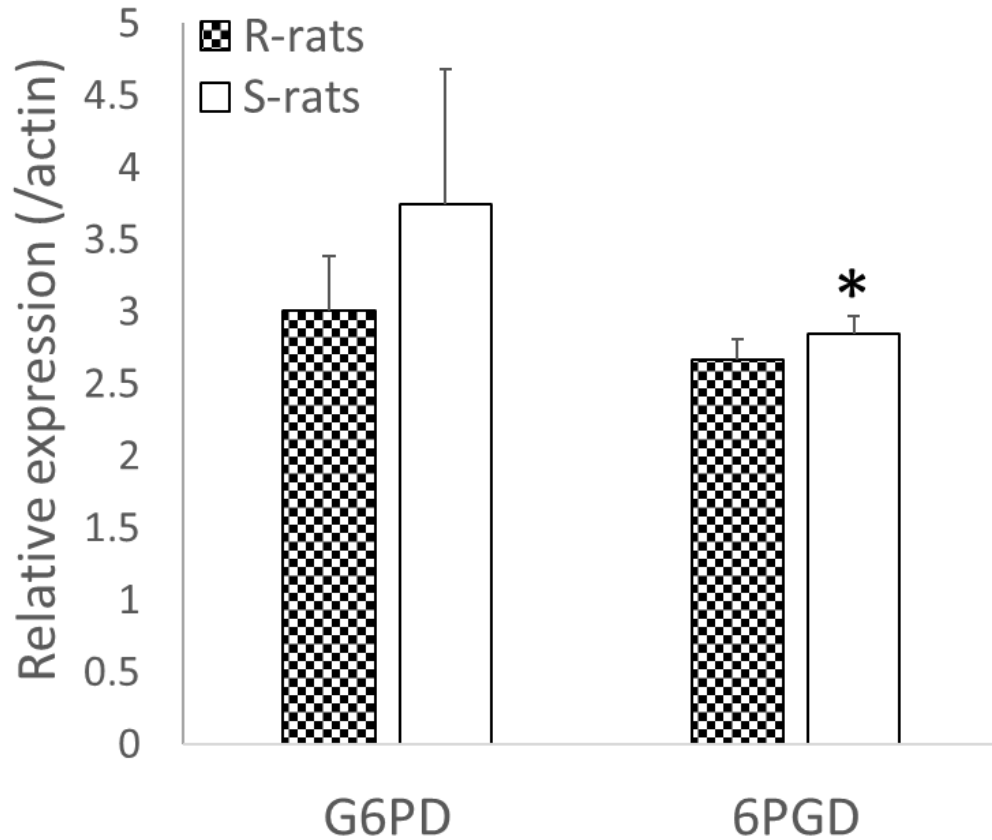


Fig. 4-8 : NADPH 産生酵素のイムノブロッティング。肝 S9 画分を使用したウエスタンブロット法によりペントースリン酸経路中で NADPH 産生を担う酵素、グルコース 6 リン酸脱水素酵素 (G6PD) とホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ (6PGD) のタンパク質発現量を半定量した。ローディングコントロールとして β -actin を用いた。R-rats : 抵抗性群、S-rats : 感受性群。縦軸は β -actin による補正值。各値は平均 \pm 標準誤差 (SEM) で示し、* は二群間で有意差がある事を示す (n = 4, Student's *t*-test, $p < 0.05$)。

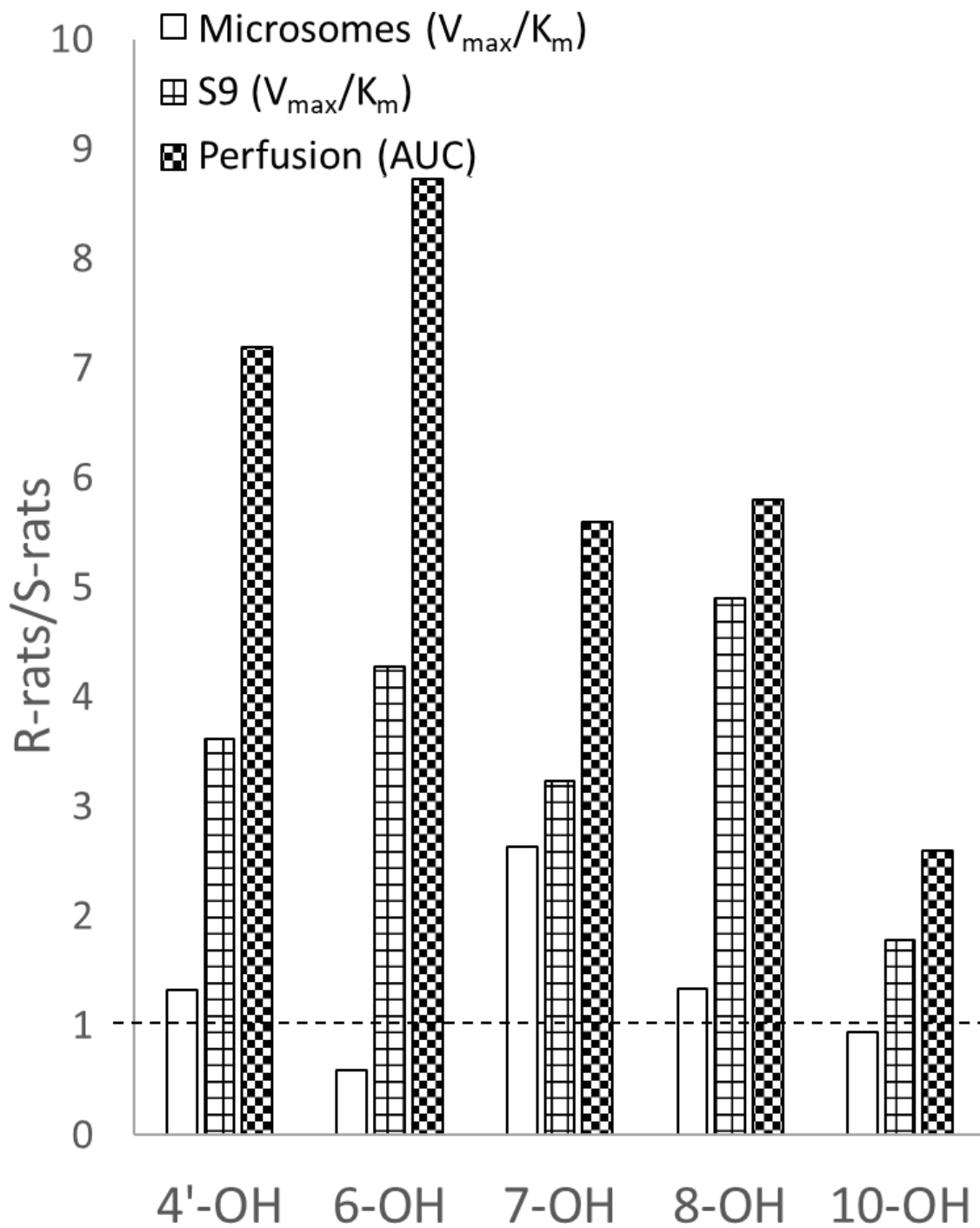


Fig. 4-9：各測定法に於ける水酸化ワルファリン代謝能の比較。*In vitro* 試験の酵素効率 (V_{max}/K_m) と第3章で実施した *in situ* 肝灌流試験の AUC について、抵抗性群 (R-rats) と感受性群 (S-rats) のワルファリン水酸化代謝活性の平均値の比として示している。

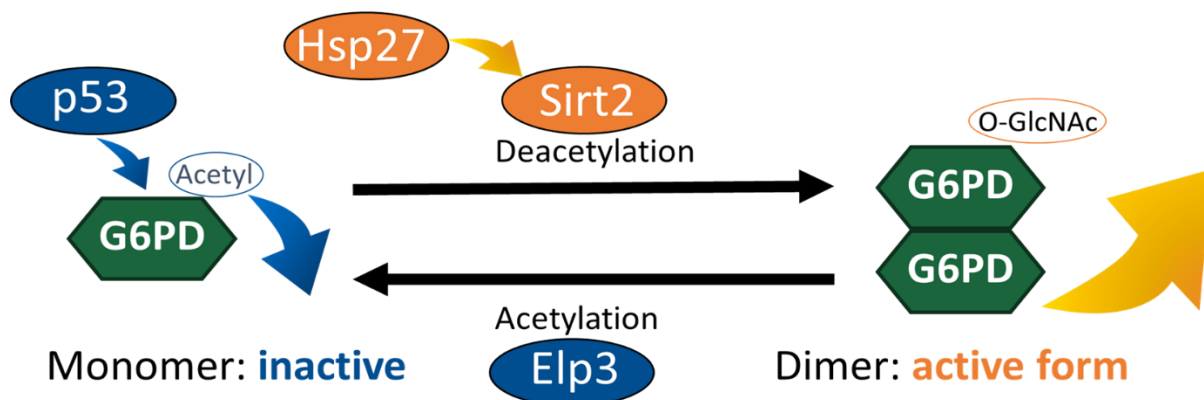


Fig. 4-10：グルコース 6 リン酸脱水素酵素（G6PD）の翻訳後活性調節機構。G6PD はペントースリン酸経路の律速酵素であり NADPH 産生を担う。G6PD は酸化ストレス等 NADPH 要求量の変化に対して種々の機序で活性調節を受ける。p53 は G6PD の活性を直接抑制する。また、G6PD は 403 番目のリシンがアセチル（Acetyl）化される事で活性化型のダイマーを形成できなくなる。NAD 依存性脱アセチル化酵素サーチュイン 2（Sirt2）は脱アセチル化により G6PD の活性を上昇させる。Sirt2 活性は熱ショックタンパク質 27（Hsp27）で向上する。G6PD のアセチル化はエロンゲーターコンプレックスタンパク質 3（Elp3、または KAT9）により担われる。また、G6PD は O-結合型 β -N-アセチルグルコサミン付加（O-GlcNAc 化）を受ける事で活性化する。

— 第五章 —

結語

総括

本研究では東京で捕獲された殺鼠剤抵抗性クマネズミのクローズドコロニーを用いた各試験系により、代表的な抗血液凝固系殺鼠剤であるワルファリンへの応答を多角的に解析した。

第二章では東京の抵抗性ラットで多数確認されている変異パターンである Leu76Pro 変異が殺鼠剤標的分子ビタミン K エポキシド還元酵素 (VKOR) の VKO 還元活性やワルファリン感受性に与える影響を *in vitro* 酵素速度論的手法や *in silico* の結合性シミュレーションで解析した。その結果、Leu76Pro 変異は結合ポケットから離れた ER ループ構造上にあるにも拘らず、ワルファリンに対し顕著な抵抗性を生じさせる他、VKOR の VKO 還元活性も低下させる事が判明した。また、そのメカニズムとして本変異がワルファリンへの最も強力な結合サイトとされる ER ループ上の Phe55 とワルファリンとの親和性の低下、ER ループ部位の可動性の低下させている可能性が示唆された。

第三章では本抵抗性群がワルファリンを摂取した際の応答を *in vivo* の薬物動態学/薬力学的に解析した。また、*in situ* 肝灌流試験を行う事で生理的に近い環境での肝代謝能を測定した。薬力学的解析では本抵抗性群ではワルファリンの 10 mg/kg 単回投与では血液凝固時間が延長せず抵抗性を有している事を示した。また、薬物動態学的解析では抵抗性群では排泄能 (クリアランス) が高くワルファリンを迅速に排泄している事が判明した。また、ワルファリンの代謝産物である水酸化ワルファリンの動態は、抵抗性群では最高濃度到達時間が有意に早いという特徴を示し、高排泄能の原因がワルファリンの高代謝能である事を示唆する結果が得られた。そこで、肝代謝能を精査するために *in situ* 肝灌流試験を実施した所、実際に抵抗性群は有意に高い水酸化ワルファリンの生成を示し、ワルファリンの高い肝代謝能を有している事が明らかとなった。

第四章ではワルファリンの水酸化反応を担う薬物代謝酵素シトクロム P450 と、その活性に必要な電子伝達系を精査し高代謝能の原因を探索した。興味深い事に、本抵抗性群の肝臓から抽出したミクロソーム画分を用いた P450 の酵素速度論的解析では、5つある水酸化体のうち、軽度な活性上昇を示す物と感受性群と同等か低い活性を示す物とに分かれ、第3章の *in situ* 試験と一致しない結果となった。そこで、本 *in vitro* 試験系で再現できない生体内の要素として、P450 の反応に不可欠な NADPH を介し

た電子伝達反応に着目した。S9 画分を用いた内因性の NADPH 産生能依存性の P450 ワルファリン代謝活性試験を行った所、抵抗性群は全ての水酸化体で感受性群より有意に高い代謝能を示し、高代謝能の原因が代謝を直接担う P450 自体の変異ではなく、その上流の NADPH 産生能の活性化である事が示唆された。そこで、肝臓中での NADPH 産生を担う主要な経路であるペントースリン酸経路を解析した所、NADPH 産生を担う G6PD、6PGD といった酵素の遺伝子配列・タンパク質発現量には変化はなかったものの、抵抗性群はこれらによる高い NADPH 産生能を示した。

以上から、本抵抗性群を用いた解析により、抵抗性の原因として従来から提唱されてきた VKOR の変異に加えて、NADPH 産生の向上とそれに伴う P450 による殺鼠剤代謝能の賦活化という新しい抵抗性獲得機序が明らかとなった。今後は高 NADPH 産生能の同定等更なる詳細なメカニズムの解析と、ペントースリン酸経路や P450 に着目した新規殺鼠剤の開発が期待される。

今後の展望

新規殺鼠剤の開発

殺鼠剤の世界市場は 2020 年に 10 億ドルを超えるとされており今後も相当数の需要があると見込まれる [114]。一方、抵抗性齧歯類は全世界で報告されており、これらへの対策は不可欠であると言える。また、現在抵抗性齧歯類へ一定の効果を示している第二世代殺鼠剤の使用で欧米では希少性の高い猛禽類での死亡事例が絶えず、8000 例近い事例が報告されている [18]。これら猛禽類は個体数が少ない事から殺鼠剤の散布に由る中毒死は散布地域の個体群の崩壊に至る危険性もある。これに対し抵抗性齧歯類に有効かつ二次被害を低減した特異性の高い殺鼠剤が望まれている。

しかしながら、新規殺鼠剤の開発に際し、駆除対象が齧歯類である事がこれを困難としている。齧歯類に対して有害な物質は哺乳類、或いは鳥類等にも有害である、つまり、殺鼠剤≒殺哺乳類剤であるため、抗血液凝固系殺鼠剤の代替として、異なる作用機序で齧歯類特異的に致死性が高い化合物を発見する事は非常に困難である。このため、比較的齧歯類への特異性が高い既存の抗血液凝固系殺鼠剤を改良した新規殺鼠剤の開発が現実的には求められる。

二次被害を低減した殺鼠剤の案として、第二世代殺鼠剤の立体異性体が現在注目を集めている。第二世代殺鼠剤の立体異性体はそれぞれで薬効に大きな差はないが排泄が速いものが含まれているという特徴がある [115–118]。第一世代殺鼠剤と比較した第二世代殺鼠剤の致死性の高さの原因として、100 日超の顕著な血中半減期の長さが挙げられる。このため、排泄の早い立体異性体を精製し蓄積性を軽減した殺鼠剤は抵抗性齧歯類特異的な殺鼠剤として有望であると考えられている。また、本研究で用い

た第一世代殺鼠剤であるワルファリンにも S-ワルファリンと R-ワルファリンの 2 つの立体異性体が存在するが S-ワルファリンの方が強い薬効を示す上、体外への排泄が速い事が知られている [78]。

これに対し、本研究の応用案として第一世代殺鼠剤と代謝の阻害剤の混合剤も有効になると考えられる。第一世代殺鼠剤は単回摂取で致死効果を示す第二世代殺鼠剤と異なり、致死効果を示すには一週間程度の反復摂取が必要である。この毒性の弱さは抵抗性群へ効きにくいという欠点もあるが、齧歯類に警戒心を起こさせにくく高い喫食率を得られるという面、或いは標的外生物での単回の誤食による致死率が低いという面でプラスにも働き得る。本研究の知見を基に P450 や NADPH 産生といった要素の阻害により致死性を高める事ができると考えられる。また、複数の阻害標的を設ける事で、各阻害剤濃度を下げ、それぞれ単独での毒性発現の可能性も下げる事ができると期待される。

NADPH が与える他の臓器や他の経路への影響

本研究で用いた抵抗性群は高 NADPH 産生能を有し P450 による高殺鼠剤解毒代謝能に寄与する事が示唆された。一方、NADPH は P450 の電子供与体としての働き以外にも、コレステロールや脂肪酸・ステロイドの合成、酸化ストレスの主要な解毒パスウェイであるグルタチオンのコファクターと生体内で様々な役割を有する。本抵抗性群に於いて、高 NADPH 産生能が上記の生理的な機能に対してどのような影響を与えているかは検討に値する。

特に、本抵抗性群は東京都新宿という大都市に生息していた個体群のため、種々の環境汚染物質により高頻度で酸化ストレスを受けていた事が予想される [119,120]。ペントースリン酸経路による NADPH 産生は酸化ストレス応答に応じて活性が上昇する、或いは癌細胞中での高活性も酸化ストレス応答のためという報告もある。本抵抗性群の高 NADPH 産生能は殺鼠剤という淘汰圧への応答の他、このような都市部で生息する際に酸化ストレス応答という面でも生存に有利に働いている可能性もある。

また、ペントースリン酸経路は今回解析した肝臓の他、脂肪組織、副腎皮質、甲状腺、赤血球、睪丸、乳腺といった臓器でも活性が高く、今回の表現型が肝臓特異的なのか、他臓器でも維持されているのかも調査すると生体内での役割の理解の一助になると考えられる。

VKOR 変異と高 NADPH 産生の関係性

本抵抗性群は VKOR の変異による殺鼠剤の低結合能、それに付随する低 VKOR 活性と、高 NADPH 産生による P450 の高殺鼠剤代謝能という 2 つの機序を併せ持つ事

が判明した。従来、VKOR 変異と P450 による解毒代謝はそれぞれが独立したものとして考えられてきたが、NADPH という要素により、これらが相互作用している可能性が浮上した。

VKOR はビタミン K サイクル中でビタミン K エポキシドからビタミン K キノンへの変換を担い、ビタミン K キノンから活性化型のヒドロキノン体への変換能は比較的低い事が知られている。そして、このキノン体からヒドロキノン体への変換は未同定の NADPH 要求性の酵素が担う事を複数の研究が支持している。本酵素がエポキシド体→キノン体への反応も触媒するかは不透明であるが、VKOR がエポキシド体→キノン体の変換に加え、試験管内では弱いながらヒドロキノンまでの触媒能も示す事を鑑みるとその可能性は否定できない。つまり、本抵抗性群は低 VKOR 活性を示す変異を有するために NADPH 依存性のビタミン K 還元経路が活性化し、それに伴う NADPH 要求量に応えるために NADPH 産生能が増加し、副次的に P450 の高代謝能も獲得した、という可能性がある。実際に、第三章で実施した *in vivo* の薬力学的解析ではワルファリン薬効発現前の平常時の PT 値は抵抗性群と感受性群で有意差がなく、活性が低い VKOR 変異を有しながら血液凝固因子産生能は正常である事が判明している。

世界で見られる Thr139Phe 変異を有する抵抗性ラットでは食餌中のビタミン K 要求量が増加したという報告がある等、変異に伴う VKOR 低活性を示唆する知見は他の変異パターンでも報告されている [121]。また、VKOR のノックアウトマウスは胚性致死を示す事から、本 VKOR 活性は食餌由来或いは体内での他の還元酵素により代償する必要がある。NADPH 高産生能の原因がビタミン K サイクルに起因するとすれば、本表現型は世界各地の抵抗性ラットでも同様に存在する可能性もあり、国内外の抵抗性ラットにおけるこれらの要素の解析も望まれる。

一方、ペントースリン酸経路の律速酵素である G6PD の活性制御機構は複数のタンパク質が関与し、G6PD 自体もアセチル化や O-結合型 β -N-アセチルグルコサミン付加と複数の翻訳後修飾を受ける等、多様かつ、その全てが解明されたとは言えない。上記の通りビタミン K サイクルも VKOR の生理的レドックスパートナーは不明の上、そもそもヒドロキノン還元酵素は未同定である。このように、ペントースリン酸経路やビタミン K サイクルは古典的な生化学的経路にも拘わらずその全貌の解明には至っていない。これに対し、殺鼠剤抵抗性齧歯類が有する低 VKOR 活性や高 NADPH 産生能といった表現型のメカニズムをより詳細に解析する事で、これらの因子の同定に繋がる事も期待される。つまり、殺鼠剤抵抗性というフィールドレベルの現象の研究を通して、普遍的な生命現象の更なる理解を得られるという点で今後も殺鼠剤抵抗性齧歯類の研究が発展する事が期待される。

Abstract

Chapter I - Introduction -

Anti-blood coagulation rodenticides, such as warfarin, have been used since the 1940s. They inhibit vitamin K epoxide reductase (VKOR), which is necessary for producing several blood clotting factors. This inhibition by rodenticides results in lethal hemorrhage in rodents. However, heavy usage of these agents has led to the appearance of rodenticide-resistant rats all over the world. Thus, it is necessary for development of novel rodenticide to reveal mechanism of the resistance. I investigated the mechanism with a closed colony of warfarin-resistant black rats (*Rattus rattus*) from Tokyo.

Chapter II - Target enzyme: VKOR -

Mutations of the VKOR enzyme can lead to resistance to those compounds. Most of these mutations lie in the vicinity of potential warfarin-binding sites within the ER-luminal loop structure (Lys30, Phe55) and the transmembrane helix (Tyr138) of VKOR. However, a VKOR mutation found in Tokyo in warfarin-resistant rats does not follow that pattern (Leu76Pro), and its effect on VKOR function and structure remains unclear. Thus, I conducted both *in vitro* kinetic analyses and *in silico* docking studies to characterize the VKOR mutant.

On the one hand, resistant rats (R-rats) showed a 37.5-fold increased IC_{50} value to warfarin when compared to susceptible rats (S-rats); on the other hand, R-rats showed a 16.5-fold lower basal VKOR activity (V_{max}/K_m). Docking calculations exhibited that the mutated VKOR of R-rats has a decreased affinity for warfarin. Molecular dynamics simulations further revealed that VKOR-associated warfarin was more exposed to solvents in R-rats and key interactions between Phe55, Lys30, and warfarin were less favored. This study concludes that a single mutation of VKOR at position 76 leads to a significant resistance to warfarin by modifying the types and numbers of intermolecular interactions between the two.

Chapter III - Assessment of ADME -

Absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) is known to have a significant effect on diversity of drug effect. Herein, pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in those rats were investigated. Prothrombin time of R-rats did not change markedly and there was no significant difference compared to the value at 0 h. R-rats had low levels of warfarin in serum and significantly higher clearance activity. Warfarin is metabolized to hydroxywarfarin by cytochrome P450 (P450). They can rapidly metabolize warfarin by hydroxylation shown as significantly earlier T_{max} of hydroxywarfarin. The levels of accumulation in the organs of R-rats were lower than those of S-rats.

To investigate warfarin metabolism in R-rats, *in situ* liver perfusion of warfarin was performed with those rats. Liver perfusion is an *in situ* methodology that can reveal hepatic

function specifically with natural composition of the liver. R-rats showed significantly higher amount of all of five metabolites (hydroxywarfarin) than those of S-rats. The results indicated R-rats showed higher hepatic warfarin hydroxylation which can lead to enhanced excretion of warfarin in *in vivo*.

Chapter IV - Investigation of the mechanism of enhanced metabolism -

In this chapter, I investigated a possible mechanism of enhanced hepatic warfarin hydroxylation activity. *In vitro* warfarin metabolism assay was performed to investigate kinetic parameters of cytochrome P450. I prepared two fractions from their liver. One is microsomes containing P450, the other is S9 fraction, including P450 and natural nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) secretion ability. NADPH plays a role in electron donation to P450. In the assay, NADPH was added to microsomes, while NADP⁺ was added to S9. The V_{max} of microsomes of R-rats showed modest difference, however, that of S9 of R-rats was significantly higher than that of S-rats. These results indicated the enhanced metabolism shouldn't be due to P450 but NADPH production ability.

I measured NADPH production activity by pentose phosphate pathway; the major source of NADPH. R-rats showed enhanced NADPH production. There were no significant differences in amino acid sequence and expression level of glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD) playing role in NADPH production in pentose phosphate pathway. G6PD is known to have post-transcriptional regulation. These results suggested the mechanism of higher NADPH production may lie in post-transcriptional regulation of G6PD.

Chapter V - Conclusion -

In this study, I revealed warfarin-resistant black rats from Tokyo had VKOR mutation and enhanced hepatic warfarin metabolism due to high NADPH production activity. Notably, this is the first report that shows enhanced NADPH production activity can contribute to rodenticide-resistance. These results have some potential to contribute to further understanding of rodenticide-resistant rodents and to the development of novel rodenticide.

論文発表

本研究は以下に示す学術誌に発表した。

1. Takeda K.* Ikenaka Y.* Tanikawa T. Tanaka K.D. Nakayama S.M.M. Mizukawa H. Ishizuka M. Novel revelation of warfarin resistant mechanism in roof rats (*Rattus rattus*) using pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis Pestic. Biochem. Physiol. 134, 1-7, 2016
*equal contribution

2. Takeda K. Ikenaka Y. Tanaka K.D. Nakayama S.M.M. Tanikawa T. Mizukawa H. Ishizuka M. Investigation of hepatic warfarin metabolism activity in rodenticide-resistant black rats (*Rattus rattus*) in Tokyo by *in situ* liver perfusion Pestic. Biochem. Physiol. 148, 42-49, 2018

参考文献

- [1] D.E. Wilson, D.M. Reeder, *Mammal Species of the World*, 2005. doi:10.2307/4498724.
- [2] G.L. Burr, *The Encyclopaedia Britannica: A Dictionary of Arts, Sciences, Literature and General Information*, *Am. Hist. Rev.* 17 (1911) 103. doi:10.2307/1832843.
- [3] 農村振興局農村政策部農村環境課鳥獣対策室農林水産省, 農作物被害状況 別添2 野生鳥獣による農作物被害の推移 (鳥獣種類別)
http://www.maff.go.jp/j/seisan/tyozyu/higai/hogai_zyoukyou/index.html (accessed December 10, 2019).
- [4] S. Davis, E. Calvet, H. Leirs, Fluctuating rodent populations and risk to humans from rodent-borne zoonoses, *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 5 (2005) 305–314. doi:10.1089/vbz.2005.5.305.
- [5] A.J. Dos Santos Grácio, M.A.A. Grácio, Plague in Madagascar, *Trop. Doct.* 48 (2018) 1–2. doi:10.1177/0049475517749302.
- [6] H.P. Jones, B.R. Tershy, E.S. Zavaleta, D.A. Croll, B.S. Keitt, M.E. Finkelstein, G.R. Howald, Severity of the effects of invasive rats on seabirds: A global review, *Conserv. Biol.* 22 (2008) 16–26. doi:10.1111/j.1523-1739.2007.00859.x.
- [7] A. Caravaggi, R.J. Cuthbert, P.G. Ryan, J. Cooper, A.L. Bond, The impacts of introduced House Mice on the breeding success of nesting seabirds on Gough Island, *Ibis (Lond. 1859)*. (2018). doi:10.1111/ibi.12664.
- [8] T. Yabe, T. Hashimoto, M. Takiguchi, M. Aoki, K. Kawakami, Seabirds in the stomach contents of Black Rats *Rattus rattus* on Higashijima, the Ogasawara (Bonin) Islands, Japan, *J. Seab. Sci. Conserv.* 37 (2009) 293–295. <http://www.marineornithology.org/content/get.cgi?rn=863> (accessed January 4, 2019).
- [9] T. Tanikawa, 谷川力, 安心して住める ネズミのいない家 *Anshinshite sumeru nezumi no inai ie*, 講談社 Kōdansha, 2006.
- [10] H.A. Campbell, K.P. Link, Studies on the hemorrhagic sweet clover disease IV. The isolation and crystallization of the hemorrhagic agent, *Nutr. Rev.* 32 (1974) 244–246. doi:10.1111/j.1753-4887.1974.tb06329.x.
- [11] J. Oldenburg, M. Marinova, C. Müller-Reible, M. Watzka, The Vitamin K Cycle, *Vitam. Horm.* 78 (2008) 35–62. doi:10.1016/S0083-6729(07)00003-9.
- [12] T. Okano, Y. Shimomura, M. Yamane, Y. Suhara, M. Kamao, M. Sugiura, K. Nakagawa, Conversion of phylloquinone (vitamin K1) into menaquinone-4 (vitamin K2) in mice: Two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 11270–11279. doi:10.1074/jbc.M702971200.
- [13] P. V. Hauschka, J.B. Lian, D.E. Cole, C.M. Gundberg, Osteocalcin and matrix Gla protein: Vitamin K-dependent proteins in bone, *Physiol. Rev.* 69 (1989) 990–1047. doi:10.1152/physrev.1989.69.3.990.
- [14] C.M. Boyle, Case of Apparent Resistance of *Rattus norvegicus* Berkenhout to Anticoagulant Poisons, *Nature.* 188 (1960) 517–517. doi:10.1038/188517a0.
- [15] Y. Ito, M. Mitsugu, J. Kawashima, S. Hattori, Susceptibility of the roof rat, *Rattus rattus*, captured in several places to warfarin and scilliroside., *Japanese J. Sanit. Zool.* 32 (1981) 251–254. https://www.jstage.jst.go.jp/article/mez/32/3/32_KJ00000821717/_pdf.
- [16] T. Tanikawa, T. Suzuki, An analysis of the lethal feeding period (LFP) of warfarin in several populations of roof rats, *Rattus rattus*, *Med. Entomol. Zool.* 44 (1993) 293–

298. doi:10.7601/mez.44.293.
- [17] A.P. Buckle, C. V Prescott, K.J. Ward, Resistance to the first and second generation anticoagulant rodenticides-A new perspective, *Proc. Sixt. Vertebr. Pest Conf.* (1994) 138–144. <https://digitalcommons.unl.edu/vpc16/7> (accessed December 12, 2019).
- [18] A. Morita, S.M.M. Nakayama, H. Mizukawa, M. Ishizuka, Y. Ikenaka, A review: poisoning by anticoagulant rodenticides in non-target animals globally, *J. Vet. Med. Sci.* 81 (2018) 298–313. doi:10.1292/jvms.17-0717.
- [19] M. Lund, Resistance to the second-generation anticoagulant rodenticides, *Proc. Elev. Vertebr. Pest Conf.* (D.O. Clark, Ed.). (1984) 89–94. <https://digitalcommons.unl.edu/vpc11/21> (accessed December 12, 2019).
- [20] T. Li, C.Y. Chang, D.Y. Jin, P.J. Lin, A. Khvorova, D.W. Stafford, Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase, *Nature.* 427 (2004) 541–544. doi:10.1038/nature02254.
- [21] S. Rost, A. Fregin, V. Ivaskevicius, E. Conzelmann, K. Hörtnagel, H.-J. Pelz, K. Lappegard, E. Seifried, I. Scharrer, E.G.D. Tuddenham, C.R. Müller, T.M. Strom, J. Oldenburg, Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2., *Nature.* 427 (2004) 537–41. doi:10.1038/nature02214.
- [22] S. Rost, H.-J. Pelz, S. Menzel, A.D. MacNicoll, V. Leon, K.-J. Song, T. Jaekel, J. Oldenburg, C.R. Muller, R. Bell, P. Caldwell, A. Zimmermann, J. Matschiner, S. Rost, A. Fregin, V. Ivaskevicius, E. Conzelmann, K. Hortnagel, H. Pelz, K. Lappegard, E. Seifried, I. Scharrer, E. Tuddenham, C. Muller, T. Strom, J. Oldenburg, T. Li, C. Chang, D. Jin, P. Lin, A. Khvorova, D. Stafford, J. Sadowski, C. Esmon, J. Suttie, C. Vermeer, M. Knapen, K. Jie, D. Grobbee, E. Cranenburg, L. Schurgers, C. Vermeer, C. Boyle, R. Redfern, J. Gill, F. Rowe, C. Plant, A. Bradfield, M. Lund, R. Johnson, A. MacNicoll, J. Gill, H. Pelz, S. Rost, M. Hunerberg, A. Fregin, A. Heiberg, K. Baert, A. MacNicoll, C. Prescott, A. Walker, J. Oldenburg, C. Muller, M. Hermodson, J. Suttie, K. Link, J. Greaves, P. Ayres, H. Thijssen, C. Janssen, J. Mosterd, J. Bishop, D. Hartley, G. Partridge, D. Cain, S. Hutson, R. Wallin, A. MacNicoll, H. Thijssen, T. Misenheimer, J. Suttie, A. MacNicoll, R. Dean, J. Greaves, P. Ayres, S. Rost, A. Fregin, M. Hünerberg, C. Bevans, C. Muller, J. Oldenburg, J. Mach, D. Harrington, S. Underwood, C. Morse, M. Shearer, E. Tuddenham, A. Mumford, R. Lasseur, C. Longin-Sauvageon, B. Videmann, M. Billeret, P. Berny, E. Benoit, J. Tie, C. Nicchitta, G. von Heijne, D. Stafford, Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice - a response to 50 years of selection pressure by warfarin?, *BMC Genet.* 10 (2009) 4. doi:10.1186/1471-2156-10-4.
- [23] B.H. Huang, Z.Y. Feng, L.F. Yue, D.D. Yao, Z.X. Gao, D.W. Wang, X.H. Liu, Warfarin resistance test and polymorphism screening in the VKORC1 gene in *Rattus flavipectus*, *J. Pest Sci.* (2004). 84 (2011) 87–92. doi:10.1007/s10340-010-0330-5.
- [24] J. Wang, Z. Feng, D. Yao, J. Sui, W. Zhong, M. Li, J. Dai, Warfarin resistance in *Rattus losea* in Guangdong Province, China, *Pestic. Biochem. Physiol.* 91 (2008) 90–95. doi:10.1016/j.pestbp.2008.01.007.
- [25] H.-J. Pelz, S. Rost, M. Hünerberg, A. Fregin, A.-C. Heiberg, K. Baert, A.D. MacNicoll, C. V Prescott, A.-S. Walker, J. Oldenburg, C.R. Müller, The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents., *Genetics.* 170 (2005) 1839–47. doi:10.1534/genetics.104.040360.
- [26] K.D. Tanaka, Y.K. Kawai, Y. Ikenaka, T. Harunari, T. Tanikawa, S. Fujita, M. Ishizuka, A novel mutation in VKORC1 and Its Effect on Enzymatic activity in Japanese Warfarin-resistant rats, *J. Vet. Med. Sci.* 75 (2013) 135–139. doi:10.1292/jvms.12-0161.

- [27] K.D. Tanaka, Y.K. Kawai, Y. Ikenaka, T. Harunari, T. Tanikawa, S. Ando, F. Okajima, S. Fujita, M. Ishizuka, The genetic mechanisms of warfarin resistance in *Rattus rattus* found in the wild in Japan, *Pestic. Biochem. Physiol.* 103 (2012) 144–151. doi:10.1016/j.pestbp.2012.04.011.
- [28] A. Heiberg, Anticoagulant resistance: a relevant issue in sewer rat (*Rattus norvegicus*) control?, *Pest Manag. Sci.* 65 (2009) 444–9. doi:10.1002/ps.1709.
- [29] J. Oldenburg, M. Watzka, C. Bevens, VKORC1 and VKORC1L1: Why do Vertebrates Have Two Vitamin K 2,3-Epoxy Reductases?, *Nutrients.* 7 (2015) 6250–6280. doi:10.3390/nu7085280.
- [30] F.P. Guengerich, G.A. Dannan, S.T. Wright, M. V. Martin, L.S. Kaminsky, Purification and characterization of liver microsomal cytochromes P-450: electrophoretic, spectral, catalytic, and immunochemical properties and inducibility of eight isozymes isolated from rats treated with phenobarbital or .beta.-naphthoflavone, *Biochemistry.* 21 (1982) 6019–6030. doi:10.1021/bi00266a045.
- [31] M.D. Markussen, A.-C. Heiberg, M. Fredholm, M. Kristensen, Differential expression of cytochrome P450 genes between bromadiolone-resistant and anticoagulant-susceptible Norway rats: a possible role for pharmacokinetics in bromadiolone resistance., *Pest Manag. Sci.* 64 (2008) 239–48. doi:10.1002/ps.1506.
- [32] M. Ishizuka, F. Okajima, T. Tanikawa, H. Min, K.D. Tanaka, K.Q. Sakamoto, S. Fujita, Elevated warfarin metabolism in warfarin-resistant roof rats (*Rattus rattus*) in Tokyo, *Drug Metab. Dispos.* 35 (2007) 62–66. doi:10.1124/dmd.106.011775.
- [33] K.E. Horak, S.F. Volker, C.M. Campton, Increased diphacinone and chlorophacinone metabolism in previously exposed wild caught voles, *Microtus californicus*, *Crop Prot.* 78 (2015) 35–39. doi:10.1016/j.cropro.2015.08.011.
- [34] L.M. Tompkins, A.D. Wallace, Mechanisms of cytochrome P450 induction, in: *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2007: pp. 176–181. doi:10.1002/jbt.20180.
- [35] T. Tanikawa, Studies on genetic analysis of warfarin resistance in roof rats, *Rattus rattus*, in Japan by crossing resistant and susceptible colonies, *Med. Entomol. Zool.* 43 (1992) 323–329. doi:10.7601/mez.43.323.
- [36] S.S. Brak, T.P. Kennedy, A. Richard Whorton, A.B. Sturrock, T.P. Huecksteadt, A.J. Ghio, J.R. Hoidal, Reactive oxygen species from NAD(P)H:quinone oxidoreductase constitutively activate NF- κ B in malignant melanoma cells, *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 280 (2001). doi:10.1152/ajpcell.2001.280.3.c659.
- [37] J.K. Tie, D.Y. Jin, D.L. Straight, D.W. Stafford, Functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells, *Blood.* 117 (2011) 2967–2974. doi:10.1182/blood-2010-08-304303.
- [38] M. Watzka, C. Geisen, C.G. Bevens, K. Sittinger, G. Spohn, S. Rost, E. Seifried, C.R. Müller, J. Oldenburg, Thirteen novel VKORC1 mutations associated with oral anticoagulant resistance: Insights into improved patient diagnosis and treatment, *J. Thromb. Haemost.* 9 (2011) 109–118. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.04095.x.
- [39] D.S. Whitton, J.A. Sadowski, J.W. Suttie, Mechanism of coumarin action: significance of vitamin K epoxy reductase inhibition., *Biochemistry.* 17 (1978) 1371–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/646989> (accessed March 24, 2019).
- [40] E.F. Hildebrandt, P.C. Preusch, J.L. Patterson, J.W. Suttie, Solubilization and characterization of vitamin K epoxy reductase from normal and warfarin-resistant rat liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.* 228 (1984) 480–492. doi:10.1016/0003-9861(84)90014-6.
- [41] A. Fregin, K.J. Czogalla, J. Gansler, S. Rost, M. Taverna, M. Watzka, C.G. Bevens, C.R. Müller, J. Oldenburg, A new cell culture-based assay quantifies vitamin K 2,3-

- epoxide reductase complex subunit 1 function and reveals warfarin resistance phenotypes not shown by the dithiothreitol-driven VKOR assay, *J. Thromb. Haemost.* 11 (2013) 872–880. doi:10.1111/jth.12185.
- [42] J. McNulty, V. Krishnamoorthy, D. Amoroso, M. Moser, Tris(3-hydroxypropyl)phosphine (THPP): A mild, air-stable reagent for the rapid, reductive cleavage of small-molecule disulfides, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25 (2015) 4114–4117. doi:10.1016/J.BMCL.2015.08.027.
- [43] C. Krettler, C.G. Bevans, C. Reinhart, M. Watzka, J. Oldenburg, Tris(3-hydroxypropyl)phosphine is superior to dithiothreitol for in vitro assessment of vitamin K 2,3-epoxide reductase activity, *Anal. Biochem.* 474 (2015) 89–94. doi:10.1016/j.ab.2014.12.004.
- [44] W. Li, S. Schulman, R.J. Dutton, D. Boyd, J. Beckwith, T.A. Rapoport, Structure of a bacterial homologue of vitamin K epoxide reductase., *Nature.* 463 (2010) 507–12. doi:10.1038/nature08720.
- [45] S. Wu, X. Chen, D.-Y. Jin, D.W. Stafford, L.G. Pedersen, J.-K. Tie, Warfarin and vitamin K epoxide reductase: a molecular accounting for observed inhibition., *Blood.* 132 (2018) 647–657. doi:10.1182/blood-2018-01-830901.
- [46] K.J. Czogalla, A. Biswas, K. Höning, V. Hornung, K. Liphardt, M. Watzka, J. Oldenburg, Warfarin and Vitamin K compete for binding to Phe55 in human VKOR, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24 (2017) 77–85. doi:10.1038/nsmb.3338.
- [47] R. Lasseur, C. Longin-Sauvageon, B. Videmann, M. Billeret, P. Berny, E. Benoit, Warfarin resistance in a French strain of rats., *J Biochem Mol Toxicol.* 19 (2005) 379–85. doi:10.1002/jbt.20104.
- [48] H.-J. Pelz, Spread of resistance to anticoagulant rodenticides in Germany, *Int. J. Pest Manag.* 53 (2007) 299–302. doi:10.1080/09670870701245223.
- [49] E.B. Wilms, D.J. Touw, J.M.H. Conemans, R. Veldkamp, M. Hermans, A new VKORC1 allelic variant (p.Trp59Arg) in a patient with partial resistance to acenocoumarol and phenprocoumon, *J. Thromb. Haemost.* 6 (2008) 1224–1226. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.02975.x.
- [50] S. Rost, H.-J. Pelz, S. Menzel, A.D. MacNicoll, V. León, K.-J. Song, T. Jäkel, J. Oldenburg, C.R. Müller, Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice – a response to 50 years of selection pressure by warfarin?, *BMC Genet.* 10 (2009) 4. doi:10.1186/1471-2156-10-4.
- [51] A. Hodroge, B. Matagrín, C. Moreau, I. Fourel, A. Hammed, E. Benoit, V. Lattard, VKORC1 mutations detected in patients resistant to vitamin K antagonists are not all associated with a resistant VKOR activity, *J. Thromb. Haemost.* 10 (2012) 2535–2543. doi:10.1111/jth.12019.
- [52] T. Tanikawa, An Eye-Lens Weight Curve for Determining Age in Black Rats, *Rattus rattus*, *J. Mammal. Soc. Japan.* 18 (1993) 49. doi:10.11238/jmammocsjapan.18.49.
- [53] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Mol. Biol. Evol.* 33 (2016) 1870–1874. doi:10.1093/molbev/msw054.
- [54] T. Omura, R. Sato, The Carbon Monoxide-binding pigment of Liver Microsomes I. Evidence for its Hemoprotein Nature, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 2370–2378. http://hero.epa.gov/index.cfm/reference/details/reference_id/12704 (accessed November 9, 2015).
- [55] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.

- doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- [56] M. Tishler, L.F. Fieser, N.L. Wendler, V. 62, Hydro, Oxido and Other Derivatives of Vitamin K_i and Related Compounds, n.d. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> (accessed January 1, 2020).
- [57] Yoshitomo Suhara, Maya Kamao, and Naoko Tsugawa, T. Okano*, Method for the Determination of Vitamin K Homologues in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, (2004). doi:10.1021/AC0489667.
- [58] U.K. LAEMMLI, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*. 227 (1970) 680–685. doi:10.1038/227680a0.
- [59] B.R. Brooks, R.E. Bruccoleri, B.D. Olafson, D.J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations, *J. Comput. Chem.* 4 (1983) 187–217. doi:10.1002/jcc.540040211.
- [60] E. Harder, W. Damm, J. Maple, C. Wu, M. Reboul, J.Y. Xiang, L. Wang, D. Lupyan, M.K. Dahlgren, J.L. Knight, J.W. Kaus, D.S. Cerutti, G. Krilov, W.L. Jorgensen, R. Abel, R.A. Friesner, OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins, *J. Chem. Theory Comput.* 12 (2016) 281–296. doi:10.1021/acs.jctc.5b00864.
- [61] R.A. Friesner, J.L. Banks, R.B. Murphy, T.A. Halgren, J.J. Klicic, D.T. Mainz, M.P. Repasky, E.H. Knoll, M. Shelley, J.K. Perry, D.E. Shaw, P. Francis, P.S. Shenkin, Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 1739–1749. doi:10.1021/jm0306430.
- [62] M.A. Kuenemann, P.A. Spears, P.E. Orndorff, D. Fourches, *In silico* Predicted Glucose-1-phosphate Uridyltransferase (GalU) Inhibitors Block a Key Pathway Required for *Listeria* Virulence, *Mol. Inform.* 37 (2018) 1800004. doi:10.1002/minf.201800004.
- [63] K.J. Bowers, D.E. Chow, H. Xu, R.O. Dror, M.P. Eastwood, B.A. Gregersen, J.L. Klepeis, I. Kolosvary, M.A. Moraes, F.D. Sacerdoti, J.K. Salmon, Y. Shan, D.E. Shaw, Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters, in: *ACM/IEEE SC 2006 Conf., IEEE, 2006*: pp. 43–43. doi:10.1109/SC.2006.54.
- [64] K.P. Watanabe, A. Saengtienchai, K.D. Tanaka, Y. Ikenaka, M. Ishizuka, Comparison of warfarin sensitivity between rat and bird species., *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 152 (2010) 114–9. doi:10.1016/j.cbpc.2010.03.006.
- [65] K.J. Czogalla, A. Biswas, A.C. Wendeln, P. Westhofen, C.R. Müller, M. Watzka, J. Oldenburg, Human VKORC1 mutations cause variable degrees of 4-hydroxycoumarin resistance and affect putative warfarin binding interfaces, *Blood*. 122 (2013) 2743–2750. doi:10.1182/blood-2013-05-501692.
- [66] M.R. Nelson, T. Johnson, L. Warren, A.R. Hughes, S.L. Chissoe, C.F. Xu, D.M. Waterworth, The genetics of drug efficacy: Opportunities and challenges, *Nat. Rev. Genet.* 17 (2016) 197–206. doi:10.1038/nrg.2016.12.
- [67] M. Wadelius, K. Sörlin, O. Wallerman, J. Karlsson, Q.Y. Yue, P.K.E. Magnusson, C. Wadelius, H. Melhus, Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors, *Pharmacogenomics J.* 4 (2004) 40–48. doi:10.1038/sj.tpj.6500220.
- [68] D.W. Nebert, C.L. Karp, Endogenous functions of the aryl hydrocarbon receptor (AHR): intersection of cytochrome P450 1 (CYP1)-metabolized eicosanoids and AHR biology., *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 36061–5. doi:10.1074/jbc.R800053200.

- [69] A. Ueda, H.K. Hamadeh, H.K. Webb, Y. Yamamoto, T. Sueyoshi, C.A. Afshari, J.M. Lehmann, M. Negishi, Diverse roles of the nuclear orphan receptor CAR in regulating hepatic genes in response to phenobarbital., *Mol. Pharmacol.* 61 (2002) 1–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752199> (accessed November 16, 2015).
- [70] S.R. Faucette, T.-C. Zhang, R. Moore, T. Sueyoshi, C.J. Omiecinski, E.L. LeCluyse, M. Negishi, H. Wang, Relative activation of human pregnane X receptor versus constitutive androstane receptor defines distinct classes of CYP2B6 and CYP3A4 inducers., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320 (2007) 72–80. doi:10.1124/jpet.106.112136.
- [71] S. Fujita, I. Chiba, M. Ishizuka, H. Hoshi, H. Iwata, A. Sakakibara, S. Tanabe, A. Kazusaka, M. Masuda, Y. Masuda, H. Nakagawa, P450 in wild animals as a biomarker of environmental impact., *Biomarkers.* 6 (2001) 19–25. doi:10.1080/135475001452751.
- [72] M. Drude, A. Heiberg, C. Alsbo, P. Stein, Involvement of hepatic xenobiotic related genes in bromadiolone resistance in wild Norway rats , *Rattus norvegicus* (Berk .), 88 (2007) 284–295. doi:10.1016/j.pestbp.2007.01.003.
- [73] T. Mine, I. Kojima, E. Ogata, Difference in sensitivity to glucagon action in three different rat liver systems, *Metabolism.* 39 (1990) 321–326. doi:10.1016/0026-0495(90)90054-G.
- [74] C. Rodríguez-Antona, M.T. Donato, A. Boobis, R.J. Edwards, P.S. Watts, J. V. Castell, M.J. Gómez-Lechón, Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: Molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells, *Xenobiotica.* 32 (2002) 505–520. doi:10.1080/00498250210128675.
- [75] H. Inoue, H. Yokota, T. Makino, A. Yuasa, S. Kato, Bisphenol a glucuronide, a major metabolite in rat bile after liver perfusion., *Drug Metab. Dispos.* 29 (2001) 1084–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11454725> (accessed December 16, 2016).
- [76] T. Sugano, K. Suda, M. Shimada, N. Oshino, Biochemical and ultrastructural evaluation of isolated rat liver systems perfused with a hemoglobin-free medium., *J. Biochem.* 83 (1978) 995–1007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/659397> (accessed December 16, 2016).
- [77] P. Newton, Y. Suputtamongkol, P. Teja-Isavadharm, S. Pukrittayakamee, V. Navaratnam, I. Bates, N. White, Antimalarial Bioavailability and Disposition of Artesunate in Acute Falciparum Malaria, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (2000) 972–977. doi:10.1128/AAC.44.4.972-977.2000.
- [78] L. Eisai Co., Information on Proper Use of Warfarin, (n.d.). <http://www.eisai.jp/medical/products/warfarin/proper-use/> (accessed November 27, 2015).
- [79] N.H.G. Holford, Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Warfarin: Understanding the Dose-Effect Relationship, *Clin. Pharmacokinet.* 11 (1986) 483–504. doi:10.2165/00003088-198611060-00005.
- [80] L.S. Kaminsky, Z.-Y. Zhang, Human P450 metabolism of warfarin, *Pharmacol. Ther.* 73 (1997) 67–74. doi:10.1016/S0163-7258(96)00140-4.
- [81] A. Zielinska, C.F. Lichti, S. Bratton, N.C. Mitchell, A. Gallus-Zawada, V.-H. Le, M. Finel, G.P. Miller, A. Radomska-Pandya, J.H. Moran, Glucuronidation of monohydroxylated warfarin metabolites by human liver microsomes and human recombinant UDP-glucuronosyltransferases., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324 (2008) 139–48. doi:10.1124/jpet.107.129858.
- [82] D.R. Jones, J.H. Moran, G.P. Miller, Warfarin and UDP-glucuronosyltransferases: writing a new chapter of metabolism., *Drug Metab. Rev.* 42 (2010) 55–61. doi:10.3109/03602530903209395.

- [83] T. Kamataki, K. Maeda, Y. Yamazoe, T. Nagai, R. Kato, Sex difference of cytochrome P-450 in the rat: Purification, characterization, and quantitation of constitutive forms of cytochrome P-450 from liver microsomes of male and female rats, *Arch. Biochem. Biophys.* 225 (1983) 758–770. doi:10.1016/0003-9861(83)90087-5.
- [84] S. Sundseth, J. Alberta, D. Waxman, Sex-specific, growth hormone-regulated transcription of the cytochrome P450 2C11 and 2C12 genes, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 3907–3914. <http://www.jbc.org/content/267/6/3907.short> (accessed November 10, 2015).
- [85] W.H. Jr, T. Gaines, Control of Norway rats with residual rodenticide warfarin, *Public Heal. Rep.* (1950). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1997122/> (accessed November 24, 2015).
- [86] E.C. Hagan, J.L. Radomski, The toxicity of 3-(acetonylbenzyl)-4-hydroxycoumarin (warfarin) to laboratory animals, *J. Am. Pharm. Assoc.* 42 (1953) 379–382. doi:10.1002/jps.3030420620.
- [87] J. McGirr, Poisoning of livestock by the newer rodenticides, insecticides and weed killers, *XVth Int. Vet. Congr. Stock.* (1953). https://scholar.google.co.jp/scholar?hl=ja&as_sdt=0,5&cluster=10548605349681117425#0 (accessed November 24, 2015).
- [88] P.R. Ortiz de Montellano, *Cytochrome P450 : structure, mechanism, and biochemistry*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005. https://books.google.co.jp/books?hl=ja&lr=lang_en%7Clang_ja&id=W5_OPK6tFdYC&oi=fnd&pg=PR19&dq=cytochrome+p450+reductase+review&ots=PTQtoyGF2r&sig=WMOpHIWcJg0CUcP_tfTPkejAhq4#v=onepage&q=cytochrome+p450+reductase+review&f=false (accessed April 12, 2017).
- [89] J.B. SCHENKMAN, H. REMMER, R.W. ESTABROOK, Spectral Studies of Drug Interaction with Hepatic Microsomal Cytochrome, *Mol. Pharmacol.* 3 (1967).
- [90] H. Yamazaki, M. Nakamura, T. Komatsu, K. Ohyama, N. Hatanaka, S. Asahi, N. Shimada, F.P. Guengerich, T. Shimada, M. Nakajima, T. Yokoi, Roles of NADPH-P450 reductase and apo- and holo-cytochrome b5 on xenobiotic oxidations catalyzed by 12 recombinant human cytochrome P450s expressed in membranes of *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.* 24 (2002) 329–337. doi:10.1006/prev.2001.1578.
- [91] T.D. Porter, The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16 (2002) 311–316. doi:10.1002/jbt.10052.
- [92] T. Oomura, Y. Ishimura, Y. Fujii, 大村恒雄, 石村巽, 藤井義明, P450の分子生物学P450 no bunshi seibutsugaku, Kōdansha, 2009.
- [93] L. Sabate, R. Franco, E.I. Canela, J.J. Centelles, M. Cascante, A model of the pentose phosphate pathway in rat liver cells, *Mol. Cell. Biochem.* 142 (1995) 9–17. doi:10.1007/BF00928908.
- [94] N.J. Kruger, A. Von Schaewen, The oxidative pentose phosphate pathway: Structure and organisation, *Curr. Opin. Plant Biol.* 6 (2003) 236–246. doi:10.1016/S1369-5266(03)00039-6.
- [95] M. Cappellini, G. Fiorelli, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *Lancet.* 371 (2008) 64–74. doi:10.1016/S0140-6736(08)60073-2.
- [96] K.C. Patra, N. Hay, The pentose phosphate pathway and cancer, *Trends Biochem. Sci.* 39 (2014) 347–354. doi:10.1016/j.tibs.2014.06.005.
- [97] P. Jiang, W. Du, M. Wu, Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer, *Protein Cell.* 5 (2014) 1–11. doi:10.1007/s13238-014-0082-8.
- [98] S.N. Hart, X.B. Zhong, P450 oxidoreductase: Genetic polymorphisms and implications

- for drug metabolism and toxicity, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4 (2008) 439–452. doi:10.1517/17425255.4.4.439.
- [99] Y. Fang, N. Gao, X. Tian, J. Zhou, H.-F. Zhang, J. Gao, X.-P. He, Q. Wen, L.-J. Jia, H. Jin, H.-L. Qiao, Effect of P450 Oxidoreductase Polymorphisms on the Metabolic Activities of Ten Cytochrome P450s Varied by Polymorphic CYP Genotypes in Human Liver Microsomes, *Cell. Physiol. Biochem.* 47 (2018) 1604–1616. doi:10.1159/000490934.
- [100] K.P. Watanabe, M. Kawata, Y. Ikenaka, S.M.M. Nakayama, C. Ishii, W.S. Darwish, A. Saengtienchai, H. Mizukawa, M. Ishizuka, Cytochrome P450-mediated warfarin metabolic ability is not a critical determinant of warfarin sensitivity in avian species: In vitro assays in several birds and in vivo assays in chicken, *Environ. Toxicol. Chem.* 34 (2015) 2328–2334. doi:10.1002/etc.3062.
- [101] T. Omura, S. Takesue, A new method for simultaneous purification of cytochrome b5 and nadph-cytochrome c reductase from rat liver microsomes, *J. Biochem.* 67 (1970) 249–257. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a129248.
- [102] J.J. McGuire, D.J. Anderson, B.J. McDonald, R. Narayanasami, B.M. Bennett, Inhibition of NADPH-cytochrome P450 reductase and glyceryl trinitrate biotransformation by diphenyleneiodonium sulfate., *Biochem. Pharmacol.* 56 (1998) 881–93. doi:10.1016/s0006-2952(98)00216-0.
- [103] Y. Dror, H.F. Sassoon, J.J. Watson, B.C. Johnson, Glucose 6-phosphate dehydrogenase assay in liver and blood, *Clin. Chim. Acta.* 28 (1970) 291–298. doi:10.1016/0009-8981(70)90093-8.
- [104] S. Filosa, A. Fico, F. Paglialunga, M. Balestrieri, A. Crooke, P. Verde, P. Abrescia, J.M. Bautista, G. Martini, Failure to increase glucose consumption through the pentose-phosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene-deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress, *Biochem. J.* 370 (2003) 935–943. doi:10.1042/BJ20021614.
- [105] P. Cohen, M.A. Rosemeyer, Human Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Purification of the Erythrocyte Enzyme and the Influence of Ions on its Activity, *Eur. J. Biochem.* 8 (1969) 1–7. doi:10.1111/j.1432-1033.1969.tb00487.x.
- [106] P. Jiang, W. Du, X. Wang, A. Mancuso, X. Gao, M. Wu, X. Yang, P53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Nat. Cell Biol.* 13 (2011) 310–316. doi:10.1038/ncb2172.
- [107] Y.-P. Wang, L.-S. Zhou, Y.-Z. Zhao, S.-W. Wang, L.-L. Chen, L.-X. Liu, Z.-Q. Ling, F.-J. Hu, Y.-P. Sun, J.-Y. Zhang, C. Yang, Y. Yang, Y. Xiong, K.-L. Guan, D. Ye, Regulation of G6PD acetylation by KAT9/SIRT2 modulates NADPH homeostasis and cell survival during oxidative stress, *EMBO J.* (2014). doi:10.1002/embj.201387224.
- [108] H. Ye, H. Huang, F. Cao, M. Chen, X. Zheng, R. Zhan, HSPB1 Enhances SIRT2-Mediated G6PD Activation and Promotes Glioma Cell Proliferation, *PLoS One.* 11 (2016) e0164285. doi:10.1371/journal.pone.0164285.
- [109] X. Rao, X. Duan, W. Mao, X. Li, Z. Li, Q. Li, Z. Zheng, H. Xu, M. Chen, P.G. Wang, Y. Wang, B. Shen, W. Yi, O-GlcNAcylation of G6PD promotes the pentose phosphate pathway and tumor growth, *Nat. Commun.* 6 (2015). doi:10.1038/ncomms9468.
- [110] S. Langbein, W.M. Frederiks, A. Zur Hausen, J. Popa, J. Lehmann, C. Weiss, P. Alken, J.F. Coy, Metastasis is promoted by a bioenergetic switch: New targets for progressive renal cell cancer, *Int. J. Cancer.* 122 (2008) 2422–2428. doi:10.1002/ijc.23403.
- [111] G. Manganelli, U. Masullo, S. Passarelli, S. Filosa, Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency: Disadvantages and Possible Benefits, *Cardiovasc.*

- Hematol. Disord. Targets. 13 (2013) 73–82. doi:10.2174/1871529x11313010008.
- [112] R. Varshney, B.S. Dwarakanath, V. Jain, Radiosensitization by 6-aminonicotinamide and 2-deoxy-D-glucose in human cancer cells, *Int. J. Radiat. Biol.* 81 (2005) 397–408. doi:10.1080/09553000500148590.
- [113] M.J. Coon, Enzyme ingenuity in biological oxidations: A trail leading to cytochrome P450, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 28351–28363. doi:10.1074/jbc.R200015200.
- [114] Global Rodenticides Market worth USD 1004.72 Million in 2021, (n.d.). <https://www.zionmarketresearch.com/news/global-rodenticides-market> (accessed September 18, 2019).
- [115] M. Damin-Pernik, B. Espana, S. Lefebvre, I. Fourel, H. Caruel, E. Benoit, V. Lattard, Management of Rodent Populations by Anticoagulant Rodenticides: Toward Third-Generation Anticoagulant Rodenticides., *Drug Metab. Dispos.* 45 (2017) 160–165. doi:10.1124/dmd.116.073791.
- [116] I. Fourel, M. Damin-Pernik, E. Benoit, V. Lattard, Cis-bromadiolone diastereoisomer is not involved in bromadiolone Red Kite (*Milvus milvus*) poisoning, *Sci. Total Environ.* 601–602 (2017) 1412–1417. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.06.011.
- [117] M. Damin-Pernik, B. Espana, S. Besse, I. Fourel, H. Caruel, F. Popowycz, E. Benoit, V. Lattard, Development of an ecofriendly anticoagulant rodenticide based on the stereochemistry of difenacoum, *Drug Metab. Dispos.* 44 (2016) 1872–1880. doi:10.1124/dmd.116.071688.
- [118] V. Lattard, E. Benoit, The stereoisomerism of second generation anticoagulant rodenticides: a way to improve this class of molecules to meet the requirements of society?, *Pest Manag. Sci.* 75 (2019) 887–892. doi:10.1002/ps.5155.
- [119] R. Ishiwatari, H. Takada, S.J. Yun, E. Matsumoto, Alkylbenzene pollution of Tokyo Bay sediments, *Nature.* 301 (1983) 599–600. doi:10.1038/301599a0.
- [120] A. Herrera-Dueñas, J. Pineda, M.T. Antonio, J.I. Aguirre, Oxidative stress of House Sparrow as bioindicator of urban pollution, *Ecol. Indic.* 42 (2014) 6–9. doi:10.1016/j.ecolind.2013.08.014.
- [121] J. Jacob, S. Endepols, H.-J. Pelz, E. Kampling, T.G. Cooper, C.H. Yeung, K. Redmann, S. Schlatt, Vitamin K requirement and reproduction in bromadiolone-resistant Norway rats, *Pest Manag. Sci.* 68 (2012) 378–385. doi:10.1002/ps.2273.

謝辞

本研究は、著者が北海道大学大学院獣医学研究科博士課程在学中に同大学獣医学研究科毒性学教室、石塚真由美教授の指導の下に執り行った物です。本研究の遂行に辺り、非常に多くの方々にお世話になりました。由って此処に深く感謝の意を表します。

本研究を完成させるにあたり、指導教官である石塚真由美先生には学部5年生の時より合計6年間、格別のご指導・ご鞭撻を賜りました。博士課程を終えつつある今も石塚先生の求める実験量・水準を満たす事が出来たためしがないように感じており汗顔の至りではありますが、私の選択を尊重し、その時々適切なご指導・ご助力をいただいた御蔭で何とかこの博士論文を書き上げる事が出来たと存じます。これまでのご指導を胸に、今後の研究者人生で何とか石塚先生の様な研究者となる事が出来るよう精進したいと存じます。

本博士論文の副査を務めてくださいました乙黒兼一先生（北海道大学大学院獣医学研究科薬理学教室、教授）、池中良徳先生（北海道大学大学院獣医学研究科毒性学教室、准教授）、川合佑典先生（帯広畜産大学動物・食品検査診断センター 毒性解析分野、助教）からは、各年度の報告会も含め大学院での研究期間全体を通して的確なご意見・ご指導をいただきました。此処に深甚なる謝意を表します。

中山翔太先生（北海道大学大学院獣医学研究科毒性学教室、助教）、水川葉月先生（愛媛大学大学院農学研究科生物環境学専攻、准教授）からは毒性学教室での日々の研究生活で、研究の話のみならず、後輩の指導や研究者としてのキャリアパスまで多岐に渡り多大なるご指導を賜りました。篤く御礼申し上げます。

抵抗性ラットクロウズドコロニーを用いた実験に関しましてはイカリ消毒株式会社技術研究所、谷川力博士、田中和之博士に甚大なるご助力をいただきました。業務の中お時間を割いて研究に協力いただき誠にありがとうございました。

酪農学園大学獣医学部獣医生化学ユニット岩野英知教授、大谷尚子博士（株式会社アステラス製薬）におかれましては肝灌流試験の技術指導をいただきました。先生方に深く感謝申し上げます。

五十嵐学先生（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター国際疫学部門、准教授）からは VKOR ホモロジーモデル構築、*in silico* シミュレーション研究のご指導をいただきました。ご丁寧なご指導に感謝致します。

Dr. Denis Fourches (Department of Chemistry, North Carolina State University, Assistant Professor)、Dr. Dhoha Triki、Mr. Xinhao Li からは VKOR のドッキングシミュレーション・分子動力学シミュレーションの実施に関しご指導・ご意見を賜りました。また、博士課程に於いて短い期間ではありましたが米国の大学に滞在して研究を行う事が

出来たのは大きな刺激となりました。心より御礼申し上げます。

Patuxent Wildlife Research Center、Dr. Barnett A. Rattner からは殺鼠剤の研究全般に対し多大なるご指導を頂戴しました。氏の数十年にも及ぶ殺鼠剤研究の成果をご教授いただいた事で、本研究にも厚みが出たと存じます。ご多忙の中にも拘わらず私のインターンシップを受入れていただき誠にありがとうございました。

本学獣医学部生時代の学年担任でありました木村和弘先生（北海道大学大学院獣医学研究院生化学教室）には、大学院に進学してからも折に触れて人生相談をさせていただきました。この場を借りて御礼申し上げます。自分も木村先生のように学生に優しい教員になれるよう今後も精進致します。

寺岡宏樹先生（酪農学園大学獣医学部獣医薬理学ユニット、教授）、生城真一先生（富山県立大学工学部生物工学科機能性食品工学、教授）、岩田久人先生（愛媛大学沿岸環境科学研究センター化学汚染・毒性解析部門、教授）、野見山桂先生（同、准教授）からは各学会でのディスカッションや研究面でのアドバイスを賜りました。先生方に深く感謝致します。

ウェスタンブロットの実施に際し大野円実博士（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター生物製剤研究開発室）からは実験の成功に欠かすべからざる御意見を頂戴致しました。米国 NIH 仕込みの技術を惜しみなくご提供いただきありがとうございました。

田中美咲さん（北海道大学大学院獣医学研究科獣医衛生学教室）、鳥居志保さん（北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター分子病態・診断部門）、房知輝君（北海道大学大学院獣医学研究科放射線学教室）、松岡慎也君（同生化学教室）、港江利奈さん（同比較病理学教室）は獣医学部時代から合計 10 年間苦楽を共にしました。何かと不安の多い博士課程を無事に乗り切ることができたのは皆との日々の他愛ない会話であったり、忌憚のないディスカッションがあつての事だと感じています。この場を借りて御礼申し上げます。

芳之内結加さん（愛媛大学沿岸環境科学研究センター化学汚染・毒性解析部門）、高口倅暉君（愛媛大学沿岸環境科学研究センター化学汚染・毒性解析部門）は他大学ながら同分野の同期生という事で、各学会で会うたびに研究について心から楽しく話す事ができました。今後も切磋琢磨できる関係である事を望みます。

毒性学教室ではスタッフの皆様、諸先輩方や後輩の皆様から研究、日常生活の双方で大変お世話になりました。機器分析に際しては一瀬貴大様から基本から応用まで幅広い手技を教わりました。特に LCMS に関しては右も左も分からぬ時分から指導いただきある程度の保守管理まで出来る様になったのは一瀬さんの御蔭です。池元夏海様には研究費の管理につきまして多大なるご高配を賜りました。川合（石井）千尋学

姉には博士課程の大部分で細やかな気遣いと励まし（と半年に一度くらいのお説教）をいただきました。適当な性格の自分が何とか博士課程を修了出来るのも千尋さんが先輩だったからだと言っても過言ではないと感じています。また、田中厚資学兄、豊巻治也学兄は全く異なる研究分野・興味関心を持っていましたが、その分お二人との話から得られる刺激は大きかったです。私と同じ殺鼠剤関連の研究をしていた森田鮎子さん、真砂皓大君、山村快哉君とは本当に長い時間共に実験をしてきました。本研究も皆の協力無しでは成し遂げられませんでした。また、招聘教員として当研究室に滞在していただきました Dr. Wageh Sobhy Darwish、Dr. M. Ramiro Pastorinho、Dr. Ana Catarina Sousa、Dr. Aksorn Saengtienchai、当研究室博士研究員の Dr. Yared Beyene Yohannes からは本研究に対しそれぞれの御専門に即した幅広い観点からのご指導を賜りました。日本での博士課程に在籍しながら多国籍な教員から指導を受ける事が出来たのは大変有意義な経験でした。此処には書ききれませんが、本当に皆様に支えられて博士課程を過ごす事が出来ました。深く感謝申し上げます。

獣医学部時代と博士課程を通して私を支えてくれた父 融、母 寿美代、祖父 伊藤安治、祖母 伊藤エミ子、そして、相良瑠美様に心より御礼申し上げます。

また、本研究は日本学術振興会特別研究員 DC1、北海道大学大学院獣医学研究院リーディングプログラム科学研究費、愛媛大学沿岸環境科学研究センター共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」の助成を受け実施致しました。この場を借りて篤く御礼申し上げます。

最後に、本研究は実験に供された動物達の尊い命無しには成立し得ませんでした。本研究の遂行にあたり犠牲になった動物達に感謝すると共に、心からご冥福をお祈り申し上げます。