

論文の内容の要旨

論文題目 創薬段階でのmechanism-based inhibition (MBI)による薬物間相互作用回避に向けたスクリーニング系構築とMBI発現メカニズムの解析

氏 名 渡邊 亜紀子

序論

薬物代謝酵素を介した薬物間相互作用(drug-drug interaction; DDI)の中でも、特に酵素阻害作用を介したDDIは、阻害薬が併用薬の代謝を阻害することで血中暴露を過剰に上昇させるものであり、臨床で重篤な副作用を引き起こす可能性があることから、創薬初期段階からDDIリスクの回避を意識した化合物の合成展開を進めることが必要である。シトクロムP450 (cytochrome P450, CYP)は主要な薬物代謝酵素群であり、その阻害作用のうちmechanism-based inhibition (MBI)は、化合物が代謝されて生成される反応性中間体がアポ蛋白もしくはヘムに共有結合するか、ヘム鉄と配位結合してmetabolite-intermediate (MI) complex形成し、酵素活性を阻害するものである。そのため、阻害剤が血中／組織中から消失後も、酵素が新しく合成されるまで阻害作用が持続するため作用が強力であり、特に開発候補化合物として回避すべき薬物特性である。創薬段階において、CYP阻害作用が回避されなかった場合には前臨床段階での詳細なDDIリスクアセスメントによる臨床DDI試験の必要性有無の判断、そして主に臨床第Ⅰ相期間中の臨床第Ⅱ相での患者への治験薬投与に向けたDDI試験の実施が必要となる。これにより臨床試験の遅延、もしくは臨床で重篤なDDIが確認された場合には、開発中止となる可能性もある。そのため、創薬段階でのDDIリスクを回避した化合物の獲得は重要な課題である。

本研究では、CYP阻害作用の中でも特にMBIに着目し、創薬段階からMBIによるDDIリスクを回避した化合物の合成展開を推進することを目的として以下の研究に取り組んだ。

1. CYP3Aに対するMBIスクリーニング系を用いた臨床でのDDIリスク評価系の構築

CYPの中でも、CYP3Aは多数の薬物の代謝に関わる重要な酵素であることから、CYP3Aに対するMBIスクリーニング系を構築することとした。MBIによる阻害作用は化合物の濃度および反応時間依存的であることから、通常in vitroでの評価は複数の化合物濃度および反応

時点を設定して行われるが、創薬段階では化合物の合成展開に合わせたタイムリーな評価を行うため、ハイスループットな評価系の構築が必要である。今回は1濃度の被験化合物を30分間ヒト肝ミクロソーム中に暴露させた後の残存酵素活性(% remaining)を評価の指標としたスクリーニング系を構築した。本スクリーニング系を用いて、市販薬171化合物の評価を実施し、% remainingと臨床での血中または血漿中濃度との関係を検討した。この相関図において、臨床でMBIによるDDIが問題となっていない化合物は主に80% remaining以上に位置し、80% remaining以上であれば臨床血中濃度によらずMBIによるDDIは問題にならないと考えられた(zone 1)。80% remainingより下の化合物群を臨床血中濃度およびDDIリスクから3つにzone分けすることとした(zone 2-4)。MBIポテンシャルを有し、臨床でDDIが問題となっている化合物は臨床血中濃度0.1~10 μM 付近に多く存在した。一方、ethynylestradiolは強力なMBIポテンシャルを有するが、臨床血中濃度が0.001 μM と非常に低いためDDIが問題となっていない。そこで、ethynylestradiolのようにMBIポテンシャルを有していても臨床血中濃度が低いためにDDI発現の可能性が低いと考えられる領域をzone 2、代表的なMBI化合物が多く存在し、MBIによるDDI発現の可能性が高いと考えられる領域をzone 3と設定した。また、強いMBIポテンシャルを有し、臨床血中濃度が10 μM 以上と高い領域には抗HIV薬であるdelavirdineしか存在しなかった。Delavirdineは、CYP3Aで代謝される抗HIV薬の血中暴露を上げて効果を増強させるために併用される化合物であり、通常の医薬品とは使用方法が異なる。このことから、delavirdineを含む領域は市販薬としての素質が低いとしてzone 4と設定した。

以上より、創薬初期段階からMBIによるDDIリスクを回避するための合成展開を進める上で活用可能なスクリーニング系を構築することができた。また、評価結果と目標とする臨床血中濃度からDDIリスクを把握することが可能となり、DDIリスク回避の合成展開の方策を合成研究者に示すのに有用なツールとなった。

2. 社内で合成されたフルオロキノロン系抗菌薬のCYP3Aに対するMBI発現のメカニズム解析

社内で開発候補品となったフルオロキノロン系抗菌薬であるcompound 1および8はCYP3Aに対してMBIポテンシャルを有し、compound 8の側鎖のアミノ基の根元の炭素原子にメチル基を導入したcompound 10では、薬理活性を維持したままMBIを回避した。しかしこれらの化合物のMBIの原因構造やcompound 10のMBI回避におけるメチル基の効果は不明であった。そこで構造が類似する一連のフルオロキノロン系抗菌薬を用いてCYP3Aに対するMBI発現メカニズムを明らかにするとともに、compound 10のMBI回避におけるメチル基導入の影響を検討することとした。

MBIはその反応性代謝中間体のCYPへの結合様式の違いにより、アポ蛋白もしくはヘムへの共有結合によるirreversible inhibitionと、ヘム鉄とのmetabolite-intermediate (MI) complex形成によるquasi-irreversible inhibitionに分類される。In vitroにおいてMI complexはフェリシア

ン化カリウムによりヘム鉄を酸化することで解離して酵素活性が回復するというものを利用し、両結合様式を分離評価する系を構築した。まず、CYP3Aファミリーに属する主要な分子種のうち、CYP3A4に対するフルオロキノロン系抗菌薬の結合性を評価した。その結果、側鎖構造により結合性が異なり、compound 1-5はirreversible inhibitionを示すのに対し、compound 6-9はquasi-irreversible inhibitionを示した。Compound 10はCYP3A4に対して阻害作用を示さなかった。さらにMI complexが455 nm付近に特徴的なsoretピークを示すことを利用して、化合物とCYP3A4との反応液中での455 nmと490 nmの吸光度差の時間推移からMI complex形成を確認した。Compound 6および8では吸光度差の時間依存的な増加が観察されたが、compound 10では観察されなかった。このことから、quasi-irreversible inhibitorはMI complexを形成していることが確認された。

次に、両結合様式の原因となる構造を探るため、CYP3A4のirreversible inhibitorのcompound 1とquasi-irreversible inhibitorのcompound 6のCYP3A4によって生成される代謝物の同定を行い、代謝経路を推定した。その結果、両化合物とも側鎖のアミノ基の一電子酸化（水素引き抜き）による窒素ラジカルを生成するが、アミノ基の結合する環状構造の違いから、その後の反応が異なると考えられた。シクロプロパン環が結合するcompound 1では、その歪みにより窒素ラジカルが不安定でラジカル反応により開環し、炭素ラジカルが生成し、これがアポ蛋白への共有結合によるirreversible inhibitionを引き起こすと考えられた。一方、アミノ基がシクロペンタン環に結合するcompound 6では、歪みが少なく窒素ラジカルが比較的安定なためアミン上で水酸化が起これ、ニトロソ体が生成し、MI complex形成によるquasi-irreversible inhibitionが起これと考えられた。また、CYP3A4に対して阻害作用を示さないcompound 10については、当初MI complex形成に関わる代謝物が生成しないものと考えられていたが、代謝物解析の結果、compound 6と同様の代謝反応が進行している可能性が示唆された。すなわち、アミノ基に隣接するメチル基は代謝反応には影響を与えず、MI complex形成に影響を与える可能性が示唆された。Compound 6とそのニトロソ体とCYP3A4とのドッキングスタディから、アミノ基の根元に導入されたメチル基はヘム鉄と立体障害を生じ、そのためヘム鉄と窒素原子がMI complexを形成する上で最適な配座を維持できないものと考えられた。

次に、フルオロキノロン系抗菌薬のCYP3A5に対する結合性を評価した。Compound 1-5はCYP3A4と同様にirreversible inhibitionを示したが、compound 6-9はCYP3A4とは異なり阻害作用を示さず、MI complexの形成も観察されなかった。Compound 1および6でCYP3A5による代謝物を評価したところ、いずれの化合物でもCYP3A4の場合と共通した代謝物が検出され、compound 1は両分子種で同様のメカニズムによりirreversible inhibitionを引き起こしていること、またcompound 6はCYP3A5でもニトロソ体は生成されるがMI complexは形成されないことが示唆された。CYP3A4とCYP3A5の基質結合ポケットの構造の違いを把握するため、CYP3A5のホモロジーモデルを作成し、既存のCYP3A4とcompound 6のニトロソ体とのドッキングモデルを重ね合わせた。その結果、compound 6のニトロソ体の結合部位周辺で9個の

疎水性アミノ酸が両分子種で異なり、特にCYP3A5のPhe210が化合物と立体障害を生じる可能性が示唆された。このため、MI complexが形成できないと考えられた。

以上より、フルオロキノロン系抗菌薬のMBI発現メカニズムを同定し、compound 10に導入されたメチル基はその立体障害により代謝反応ではなくMI complex形成を阻害すること、また、CYP3A4とCYP3A5の基質結合ポケット構造の違い、特にCYP3A5のPhe210がquasi-irreversible inhibitorのMI complex形成に影響を与える可能性を示した。

結論

MBIスクリーニング系を構築し、創薬初期段階からのMBIによるDDIリスクを回避した化合物の合成展開に貢献した。また、社内フルオロキノロン系抗菌薬のMBI発現メカニズムに関する一連の解析から、MBI原因構造推定に関する手法を示すことができた。さらにCYP3A4とCYP3A5の基質結合ポケット構造の違いがMI complex形成に影響を与える可能性、またMI complex形成はヘム鉄との結合部位付近への置換基導入による立体障害の付与により阻害されることが示され、これは今後のMBI回避の合成展開の指針となりうると考えられる。

本研究を通じて得られた知見は創薬段階での効率的なMBIによるDDIリスクを回避した化合物の獲得に貢献し、臨床試験の短縮および成功確立の向上につながることも期待される。