

審査の結果の要旨

氏名 渡邊 亜紀子

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。

申請者である渡邊は、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研究を行った。本論文では、CYPの中でも特に重要なCYP3Aに対するハイスループットなMBI評価系を構築し、市販薬を用いて本スクリーニング系の臨床DDIリスク評価系としての妥当性を検証した。また、CYP3Aに対してMBIを示すフルオロキノロン系抗菌薬を用いて、in vitroでのCYPに対する結合性評価、代謝物構造解析およびドッキングスタディによりMBI発現メカニズムの解析を行った。これらの検討を通じ、本スクリーニング系が創薬段階でのMBIによるDDIリスクを評価するのに有用であることを示した。またCYP3Aに対するMBI回避に向けた合成展開に向けて重要な知見を得た。学位論文は2章で構成されており、第1章ではMBIスクリーニング系の構築について、第2章ではフルオロキノロン系抗菌薬のCYP3Aに対するMBI発現メカニズム解析について述べている。

第1章 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

申請者は、CYPの中でも、主要な代謝酵素であるCYP3Aに対するMBI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分けした(zone 2-4)。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delavirdineしかなく、この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。本スクリーニング系を用いて創薬初期段階からMBIによるDDIリスクを把握することが可能であり、DDIリスク回避の合成展開を進める上で有用なツールであることが示された。

第2章 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

第1節 フルオロキノロン系抗菌薬のCYP3A4に対するMBI発現メカニズムの解析

申請者は、CYP3Aに対してMBIを示すフルオロキノロン系抗菌薬を用いてそのMBI発現メカニズムを明らかにするとともに、compound 8からcompound 10へのMBI回避におけるメチル基導入の影響を検討した。

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。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。また、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り、ニトロソ体が生成し、MI complex形成によるquasi-irreversible inhibitionが起こると考えられた。また、CYP3A4に対して阻害作用を示さないcompound 10についても、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。

第2節 フルオロキノロン系抗菌薬のCYP3A4およびCYP3A5に対するMBI発現メカニズムの違い

もう一つのCYP3Aファミリーの主要な分子種であるCYP3A5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。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の場合と共に代謝物が検出され、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。

以上のように、申請者は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発現メカニズムを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。これらの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。

よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。