

博士学位論文 2021 年度

安全性の高い創薬研究を推進する
代謝活性化リスク評価法の開発

-広範な反応性代謝物を捕捉する新規蛍光
標識トラッピング剤の合成とその評価-

慶應義塾大学大学院薬学研究科

柴崎 智香子

安全性の高い創薬研究を推進する代謝活性化リスク評価法の開発
-広範な反応性代謝物を捕捉する新規蛍光標識トラッピング剤の合成とその評価-

81855073 柴崎 智香子

指導教員 熊谷 直哉 教授

担当教員 大江 知之 准教授

【背景と研究目的】

医薬品が代謝を受けて生じる反応性の高い代謝物は重篤な毒性に関与している可能性が示唆されている。この代謝過程は代謝活性化と呼ばれ、生じる代謝物を反応性代謝物という。反応性代謝物はタンパク質やDNAなどの生体内高分子と共有結合を形成し、肝毒性やアレルギー、変異原性、組織壊死などの有害反応を引き起こすと考えられている。中でも特異体質性薬物反応は、低い発生頻度と重篤な症状を特徴とし、その低い発症確率ゆえ発見に至るのは大規模な数の患者に投与が行われる開発後期や販売開始後であることが多い。また、その症状は重篤であるため、特異体質性薬物反応が認められた医薬品については開発中止や販売中止に追い込まれることもある。

反応性代謝物は重篤な副作用の原因と考えられているため、安全な医薬品の創製において反応性代謝物に対するリスク評価は必要不可欠である。また、創薬研究における効率を考慮すると、反応性代謝物のリスク評価は早期に行うことが望ましい。しかし、反応性代謝物は不安定かつ反応性が高く直接検出することは困難であるため、これまでにいくつかの検出法が研究されてきた。本研究では複数存在する反応性代謝物のリスク評価法の中でもトラッピング試験に着目した。トラッピング試験では不安定な反応性代謝物をトラッピング剤で捕捉し、安定な付加体(アダクト)としてLC/MSなどで検出する。手法が簡便であり、多くの被験化合物に対してスクリーニング的に実施できるため、創薬初期段階に適した試験である。また、トラッピング試験から得られた反応性代謝物の構造に関する情報をもとに構造の最適化につなげることが可能である。しかし、トラッピング試験における課題として、1) Cytochrome P450 (CYP) による酸化代謝で生じる広範な反応性代謝物を一挙に捕捉できる蛍光標識トラッピング剤が存在しないこと、2) カルボキシ基を有する医薬品がグルクロン酸抱合代謝を受けて生じる反応性アシルグルクロニドを効率よく捕捉できるトラッピング剤が存在しないこと、3) ミクロソームを酵素源として用いるトラッピング試験では反応性代謝物の生成条件が実際の生体内条件とは大きく異なることが挙げられる。そこで著者は、トラッピング試験での反応性代謝物のリスク予測性の向上を目指し、本研究ではこれら 3 つの課題に対する解決策を検討した。

【第1章: CYP 酸化代謝で生じる広範な反応性代謝物を捕捉する新規蛍光標識トラッピング剤の創製】

CYP による酸化代謝で生じる反応性代謝物は、その反応性の違いからソフトあるいはハードな求電子性化合物に分けられ、トラッピング剤も同様にソフトまたはハードな求核剤に分類される。ソフトな求核性を示すトラッピング剤はソフトな反応性代謝物を、ハードな求核性を示すトラッピング剤はハードな反応性代謝物を効率的に捕捉する。現在汎用されているトラッピング剤の **dansyl GSH (dGSH, Figure 1)** はダンシル基

で蛍光標識されており、アダクトを高感度で検出する。しかし、**dGSH** はソフトな求核性を示すチオール基を有するためソフトな反応性代謝物であるキノンやキノンメチドなどをトラップするが、アルデヒドのようなハードな反応性代謝物を効率よく捕捉できない。以上を踏まえ、第 1 章ではソフトな反応性代謝物に加えハードな反応性代謝物も捕捉できる蛍光標識トラッピング剤の創製を目指した。

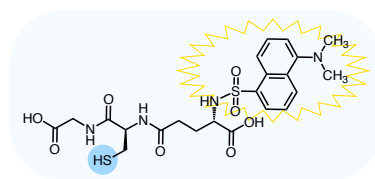
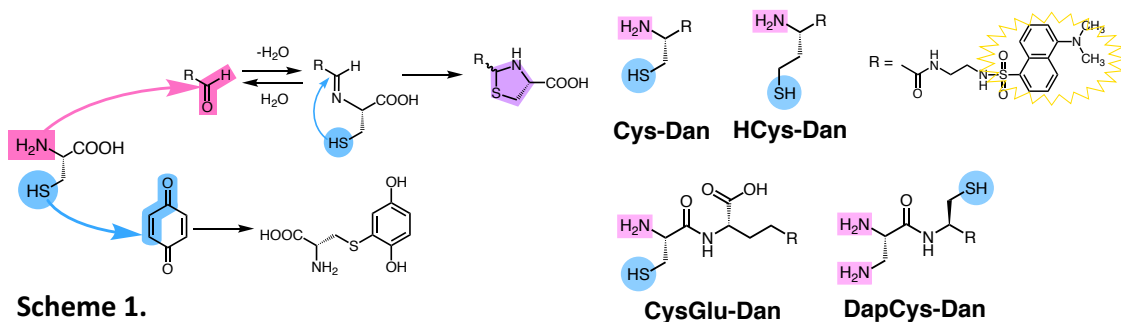


Figure 1. **dGSH**の構造

トラッピング剤のデザイン

Cysteine はソフトおよびハードな求核性置換基としてチオール基とアミノ基を持ち、ソフトとハード両タイプの反応性代謝物を捕捉する。また、両置換基でアルデヒドを捕捉し、安定なチアゾリジン環を形成することが知られている (**Scheme 1**)。そこで学部卒業研究時には **cysteine** を基盤として **Cys-Dan** と **HCys-Dan** (**Figure 2**) を創製した。トラッピング試験の結果、アルデヒドと安定なアダクトを形成した一方、troglitazone から生じるキノンメチドとのアダクト形成量は **dGSH** と比較して少ないことを明らかとした。創製したトラッピング剤でアダクト形成量が低下した原因として、1) **CYP** を阻害し反応性代謝物生成量が低下してしまうこと、2) 反応性代謝物を捕捉するチオール基が酸化されやすくトラッピング剤が消費されてしまうことを挙げた。

そこで本研究では、**dGSH** と同様にカルボキシ基を持つ **glutamic acid** を導入し極性を向上させ、**CYP** の基質結合部位での **CYP** との相互作用の低下を図った **CysGlu-Dan** (**Figure 2**) をデザインした。また、ジスルフィド結合を介した酸化体形成のしやすさにはチオール基近傍に存在するアミノ基が影響していると考え、チオール基とアミノ基の距離を離れた **DapCys-Dan** (**Figure 2**) をデザインした。



Scheme 1.

Cysteineによる反応性代謝物のトラップ機構

Figure 2. 各トラッピング剤の構造

トラッピング剤の合成

CysGlu-Dan は **cysteine** 保護体と **glutamic acid** 保護体のジペプチドを形成し、リンカーの **ethylenediamine** を介して **dansyl** 基を導入後、脱保護して得た。**DapCys-Dan** は **cysteine** 保護体に対し **ethylenediamine** を介して **dansyl** 基を導入後、**2,3-diaminopropanoic acid** の保護体とアミド結合を形成し、脱保護することで得た。

CYP 阻害試験

薬物代謝に重要な CYP 分子種 (CYP1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4) に対するトラッピング剤の阻害能を検討した。各 7 種類の CYP 分子種に特異的なマーカー基質をトラッピング剤存在下あるいは非存在下で代謝させ、代謝物の生成量を比較した。

トラッピング試験

基質をトラッピング剤存在下、ヒト肝マイクロソームとインキュベーションし、反応液を蛍光検出器付きの HPLC (LC/FL) あるいは LC/MS で解析した。基質とした糖尿病薬の troglitazone と高血圧薬の pargyline はどちらも肝毒性が原因で市場撤退となっており、その毒性には反応性代謝物の関与が疑われている。

アダクトの定量的評価

蛍光検出器で測定されるアダクトの蛍光強度は保持時間における移動相の割合によって影響を受けるため、蛍光クロマトグラムで得られたアダクトピーク面積 ($Area_{Detected}$) は補正係数 (f_{TR}) を用い、次の式で補正した。 $Area_{Corrected} = Area_{Detected} \times f_{TR}$

各トラッピング剤の f_{TR} は励起波長 340 nm での蛍光スペクトルを取得し、蛍光波長 525 nm での蛍光強度より算出した。

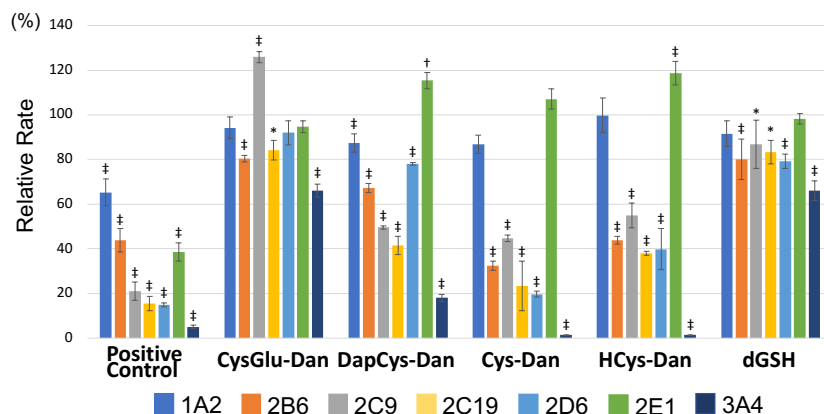


Figure 3.
各トラッピング剤の CYP 阻害プロファイル
(* $p < 0.05$, † $p < 0.01$, ‡ $p < 0.001$ vs control, n=3, one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test.
Positive control: furafylline for CYP1A2; sertraline for CYP2B6; sulfaphenazole for CYP2C9; ticlopidine for CYP2C19; quinidine for CYP2D6; clomethiazole for CYP2E1; ketoconazole for CYP3A4.)

Table 1. CysGlu-Dan, DapCys-Dan, Cys-Dan, HCys-Dan, dGSH におけるトラッピング能の比較

	Substrate	Type of RM	Electrophilicity of RM	$Area_{Corrected}$ [$10^{-3}AU \times s$]				
				CG-D	DC-D	C-D	HC-D	dGSH
Model Substrate	Benzyl alcohol	Aldehyde	Hard	717	–	1373	1767	–
	Ethynylbenzene	Ketene	Hard	1305	N.T.	2059	1417	–
	p-Cresol	Quinone methide Quinone	Soft Soft	229 213	N.T.	193 35	55 –	181 129
Drug	Troglitazone	Quinone methide	Soft	76	8	4	4	31
	Pargyline	Propargyl aldehyde	Soft and Hard	242	N.T.	–	–	–

RM: reactive metabolite; CG-D: CysGlu-Dan; DC-D: DapCys-Dan; C-D: Cys-Dan; HC-D: HCys-Dan; AU: arbitrary unit; –: not detected; N.T.: not tested.

CYP 阻害試験の結果 (Figure 3)、Cys-Dan と HCys-Dan に強い CYP3A4 阻害能が確認された一方、CysGlu-Dan と dGSH の CYP3A4 阻害作用は比較的弱かった。また、トラッピング試験 (Table 1) では、CysGlu-Dan で troglitazone 代謝物とのアダクト形成量がいずれのトラッピング剤よりも多かったことから、アダクト形成量の違いは CYP3A4 阻害能の程度の差に起因することが示唆された。DapCys-Dan は酸化体形成が

抑制されていたにもかかわらず、troglitazone 代謝物とのアダクト生成量が少なかったのは強い CYP3A4 阻害作用に起因すると考えた。**CysGlu-Dan** はいずれの CYP 分子種に対しても強い阻害能を示さなかったため、反応性代謝物の生成量を過小評価してしまうリスクは低いと考えられる。また、トラッピング試験では **CysGlu-Dan** はソフトおよびハードな反応性代謝物を網羅的に捕捉し、アルデヒドと安定なアダクトを形成することを確認した。以上より、**CysGlu-Dan** は CYP 酸化代謝で生じる反応性代謝物に対するリスク評価において有用であることが示唆された。

【第2章: 反応性アシルグルクロニドを捕捉する新規蛍光標識トラッピング剤の創製】

アシルグルクロニドは高い反応性を示す場合があるため反応性代謝物として知られ、タンパク質をアシル化あるいはグリコシル化することで毒性を発現すると考えられている。2008年にFDAが発出した代謝物に関するガイダンスにもそのリスク評価の必要性が明記されており、反応性が高いアシルグルクロニドに対するトラッピング剤としていくつか報告がある。しかし、いずれもアシルグルクロニドと安定なアダクトを形成することができず、リスク予測の精度という観点から課題が残る。そこで第2章では、反応性アシルグルクロニドを捕捉し、安定なアダクトを形成するトラッピング剤を創製した。

トラッピング剤のデザイン

第1章で開発したトラッピング剤を含む4種類(**CysGlu-Dan**, **DapCys-Dan**, **Cys-Dan**, **HCys-Dan**)でアシルグルクロニドに対する反応性を検討した結果、ジアミン構造を持つ**DapCys-Dan**で最も多くのグリコシル化アダクトを検出した。**DapCys-Dan**によるアシルグルクロニドの捕捉に際して、cysteine構造は必要ないと考えジアミン構造のみを持つ**Dap-Dan**(Figure 4)をデザインした。

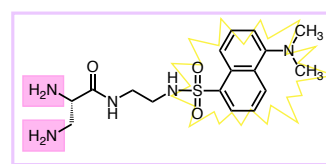


Figure 4. Dap-Danの構造

トラッピング剤の合成

Dap-Danは2,3-diaminopropanoic acid保護体を出発原料とし、ethylenediamineをリンカーとして持つdansyl基とアミド結合を形成後、脱保護して得た。

アダクトの構造解析

Dap-Danとジクロフェナクアシルグルクロニドとのアシル化アダクトは、別途化学合成した標品と比較することで同定した。グリコシル化アダクトについてはトラッピング試験のサンプルから単離精製し、¹H NMRとHH-COSYによって同定した。

トラッピング試験

カルボキシ基を有する17種類の医薬品を**Dap-Dan**存在下、ヒト肝マイクロソームとUDPGAとともにインキュベーションし、LC/FLあるいはLC/MSで解析した。基質として用いた医薬品は毒性リスクの違いから、withdrawn、warning、safeクラスに分類される。

Dap-Danとアシルグルクロニドのアダクト構造解析の結果、**Dap-Dan**は α -または β -アミノ基でアシル基を捕捉したアシル化アダクトと、 α -アミノ基でグルクロン酸部位が開環して生じるアルデヒドを捕捉し β -アミノ基にアシル基を転移させたグリコシル化

アダクトを生じることが明らかとなった (Figure 5)。トラッピング試験の結果、試験に用いた全ての医薬品においてアシルグルクロニドの生成を確認したが、毒性リスクの高い医薬品でのみ **Dap-Dan** とのグリコシル化アダクトが検出された (Table 2)。以上より、ジアミン構造を持ちアシルグルクロニドと安定なアダクトを形成できる **Dap-Dan** は反応性アシルグルクロニドに対するトラッピング剤として有用であると示唆された。

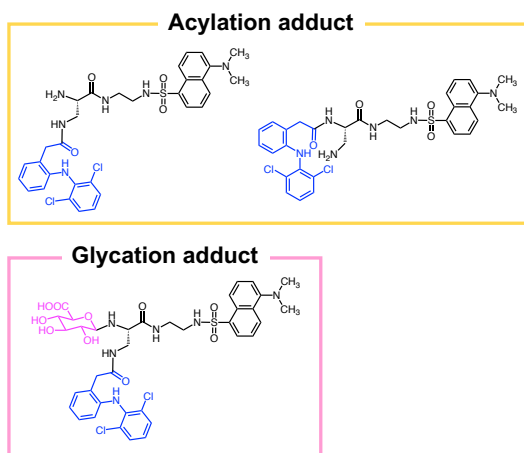


Figure 5. ジクロフェナクアシルグルクロニドに対する **Dap-Dan** のアシル化アダクトとグリコシ化アダクトの構造

Table 2. 様々な医薬品のアシルグルクロニドに対する **Dap-Dan** の反応性

	Drug	AG	Area _{Corrected} [10 ³ AU×s]	
			ACL	GLC
Withdrawn	Zomepirac	+	–	14.5
	Bromfenac	+	–	8.8
	Ibuprofen	+	21.1	13.0
	Benoxaprofen	+	9.7	79.2
	Fenclofenac	+	200	118
Warning	Tolmetin	+	–	13.3
	Diclofenac	+	248	332
	Indomethacin	+	–	13.6
	Ketoprofen	+	–	6.3
	Fenoprofen	+	59.5	37.9
	Ibuprofen	+	2.0	8.9
	Mefenamic Acid	+	–	26.6
Safe	Probenecid	+	–	–
	Furosemide	+	–	–
	Repaglinide	+	–	–
	Gemfibrozil	+	–	–
	Montelukast	+	–	–

AG: acyl glucuronide; ACL: acylation adduct; GLC: glycation adduct; AU: arbitrary unit; +: detected; -: not detected.

【第3章: ヒト肝細胞を用いたトラッピング試験系の確立とその評価】

トラッピング試験には通常肝マイクロソームを酵素源として使うが、マイクロソームによる代謝反応系は人工的に再構築されたものである。また、抱合代謝系や解毒機構も含まれないため、肝マイクロソームを用いたトラッピング試験条件は、実際の生体内での反応性代謝物の生成条件とは大きく乖離している。肝細胞を用いることが望ましいが、これまで化学標識トラッピング剤を使用した肝細胞でのトラッピング試験は前例がない。そこで第3章では、ヒト肝細胞を用いたトラッピング試験系を構築した。

トラッピング試験

基質とする医薬品をトラッピング剤存在下、初代培養ヒト肝細胞とともにインキュベーションし、反応液を LC/FL あるいは LC/MS で解析した。

トラッピング試験の結果、第2章で開発した **Dap-Dan** はヒト肝細胞内でも毒性リスクの高い医薬品から生じるアシルグルクロニドを捕捉した (Table 3)。また、反応性代謝物の定量的評価法として定評のあるヒト肝細胞での共有結合性試験と **CysGlu-Dan** によるトラッピング試験との相関性を検討したところ、強い相関が見出された ($R^2=0.888$, Figure 6)。以上より、**Dap-Dan** と **CysGlu-Dan** はヒト肝細胞を用いたトラッピング試験においても反応性代謝物の検出に有用であり、また、創薬初期段階で化合物の放射性標識体を必要とする共有結合性試験を行わずとも、**CysGlu-Dan** を用いたヒト肝細胞

でのトラッピング試験において反応性代謝物の生成に関して定量的評価を行うことができること示された。

Table 3. ヒト肝細胞におけるDap-Danの反応性

	Drug	AG	Area _{Corrected} [10 ⁻³ AU×s]	
			ACL	GLC
Withdrawn	Zomepirac	+	2.8	-
	Ibuprofen	+	18.0	-
	Fenclofenac	+	28.0	8.6
Warning	Diclofenac	+	15.7	14.1
	Indomethacin	+	6.0	-
	Ibuprofen	+	8.8	-
Safe	Furosemide	+	-	-
	Montelukast	+	-	-

AG: acyl glucuronide; ACL: acylation adduct; GLC: glycation adduct; AU: arbitrary unit; +: detected; -: not detected.

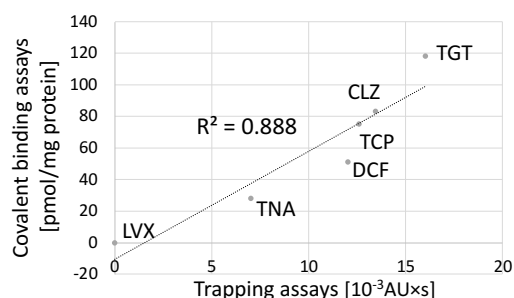


Figure 6. ヒト肝細胞におけるトラッピング試験と共有結合性試験^{1,2}との相関

TGT: troglitazone; CLZ: clozapine; TCP: ticlopidine; DCF: diclofenac; TNA: tienilic acid; LVX: levofloxacin.

1. T. Usui *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, **2009**, *37*, 2383-2392. 2. S. Nakayama *et al.*, *Drug Metab. Dispos.*, **2009**, *37*, 1970-1977.

【結語】

本研究では新規トラッピング剤として **CysGlu-Dan** と **Dap-Dan** を創製し、従来困難であった CYP 酸化による反応性代謝物の広範な捕捉と反応性アシルグルクロニドとの安定なアダクト形成を可能とした。また、生体内に近い条件でのトラッピング試験としてヒト肝細胞を用いた試験系を確立し、共有結合性試験の代替として反応性代謝物の新たな定量的評価法となりうることを提示した。以上より、本研究で得られた知見は創薬初期段階でのトラッピング試験による反応性代謝物のリスク評価において臨床予測性を大いに向上させるものであり、安全な創薬研究の推進に貢献することが期待される。

【主論文に関する原著論文】

C. Shibazaki, T. Ohe, K. Takahashi, S. Nakamura, T. Mashino, Development of fluorescent-labeled trapping reagents based on cysteine to detect soft and hard electrophilic reactive metabolites, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **2021**, *39*, 100386.

C. Shibazaki, O. Mashita, K. Takahashi, S. Nakamura, T. Mashino, T. Ohe, Development of a Fluorescent-Labeled Trapping Reagent to Detect Reactive Acyl Glucuronides, *Chemical Research in Toxicology*, **2021**, *34* (11), 2343-2352.

【参考論文】

Y. Tateishi, C. Shibazaki, K. Takahashi, S. Nakamura, Y. Kazuki, T. Mashino, T. Ohe, Synthesis and evaluation of tofacitinib analogs designed to mitigate metabolic activation, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **2021**, *43*, 100439.