

博士学位論文

グルクロン酸抱合を介した医薬品の代謝的活性化  
及びその毒性リスク評価に関する研究

**Metabolic bioactivation of drugs by glucuronidation  
and its safety risk assessment**

原田 浩史

(令和 3 年度 東京薬科大学)

グルクロン酸抱合を介した医薬品の代謝的活性化及びその毒性リスク評価に関する研究

目次

緒言 .....	5
第1章 グルクロン酸抱合を介した薬物の代謝的活性化を検出するためのトラッピング試薬の探索 .....	11
1-1 序論 .....	11
1-2 実験 .....	11
1-3 結果及び考察 .....	14
1-4 小括 .....	21
第2章 Cys 付加体の化学構造並びに生成経路の推定 .....	22
2-1 序論 .....	22
2-2 実験 .....	22
2-3 結果及び考察 .....	24
2-4 小括 .....	31
第3章 Cys 付加体の生成経路とヒト毒性リスクとの関係性 .....	33
3-1 序論 .....	33
3-2 実験 .....	34
3-3 結果及び考察 .....	37
3-4 小括 .....	45
第4章 [ <sup>35</sup> S]Cys を用いた <i>in vitro</i> トラッピングアッセイによる付加体生成量の定量化とヒト毒性リスク評価 .....	47
4-1 序論 .....	47
4-2 実験 .....	47
4-3 結果及び考察 .....	49
4-4 小括 .....	55
総括 .....	57
研究結果の掲載誌 .....	60
謝辞 .....	61
参考文献 .....	62

## 略語表

[<sup>35</sup>S]Cys: <sup>35</sup>S-labeled-L-cysteine

AA: acetic acid

AG: acyl glucuronide

BA: benzoic acid

CG: L-cysteinyl-glycine (Cys-Gly)

CYP: cytochrome P450

Cys: L-cysteine

DILI: drug-induced liver injury

dKF: dansylated KF (dansylated Lys-Phe)

DTT: dithiothreitol

FDA: Food and Drug Administration

FSA: flow scintillation analyzer

FWHM: full width at half maximum

γ-GC: *N*-L-γ-glutamyl-L-cysteine (γ-Glu-Cys)

Glu: L-glutamic acid

Gly: glycine

GSH: glutathione

γ-GTP: γ-glutamyl transpeptidase

HPLC: high-performance liquid chromatography

IDT: idiosyncratic toxicity

KF: L-lysinyll-L-phenylalanine (Lys-Phe)

LC: liquid chromatography

LC-MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Leu: L-leucine

Lys: L-lysine

MIST: Metabolite in Safety Testing

MS: mass spectrometry

MS/MS: tandem mass spectrometry

NAC: *N*-acetyl-L-cysteine

NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NSAIDs: non-steroidal anti-inflammatory drugs

PA: propionic acid

PDA: photodiode array

QTofMS: quadrupole time-of-flight mass spectrometry

S-Me-Cys: *S*-methyl-L-cysteine

UDP: uridine 5'-diphosphate

UDPGA: UDP-glucuronic acid

UGT: UDP-glucuronosyltransferase

UHPLC: ultra-high-performance liquid chromatography

UPLC: ultra-performance liquid chromatography

## 緒言

一般に、脂溶性の高い薬物や毒物などの生体外物質（異物）は、体内に存在する代謝酵素により代謝・分解を受ける。薬物代謝反応は第1相及び第2相の代謝反応に分類されるが、いずれにおいても、代謝を受けた対象物質は親水性が高まり体内から排泄されやすくなる。<sup>1)-3)</sup> 第1相代謝反応としては、エステラーゼ等による加水分解反応、cytochrome P450 (CYP) 等による酸化反応及び nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) -P450 還元酵素等による還元反応等が挙げられる。第2相代謝反応は抱合反応であり、酢酸、硫酸、グルクロン酸、アミノ酸あるいはグルタチオン (glutathione, GSH) 等の親水性の高い内因性物質を対象物質に付加する反応である。その中でも、グルクロン酸抱合は薬物等の異物代謝だけでなくビリルビン、ステロイドホルモン及び甲状腺ホルモンといった内因性物質の代謝にも関与しており、生理学的に重要な役割を担っている。<sup>4)-7)</sup> グルクロン酸抱合は小胞体膜に局在する UDP (uridine 5'-diphosphate) -グルクロン酸転移酵素 (UDP-glucuronosyltransferase, UGT) により触媒される反応であり、補酵素として UDP-グルクロン酸 (UDP-glucuronic acid, UDPGA) を要求する (Fig. 1)。<sup>7)</sup> UGT により親水性のグルクロン酸が導入された対象物質は高い水溶性を獲得し、胆汁排泄等を介して体外へ排泄される。

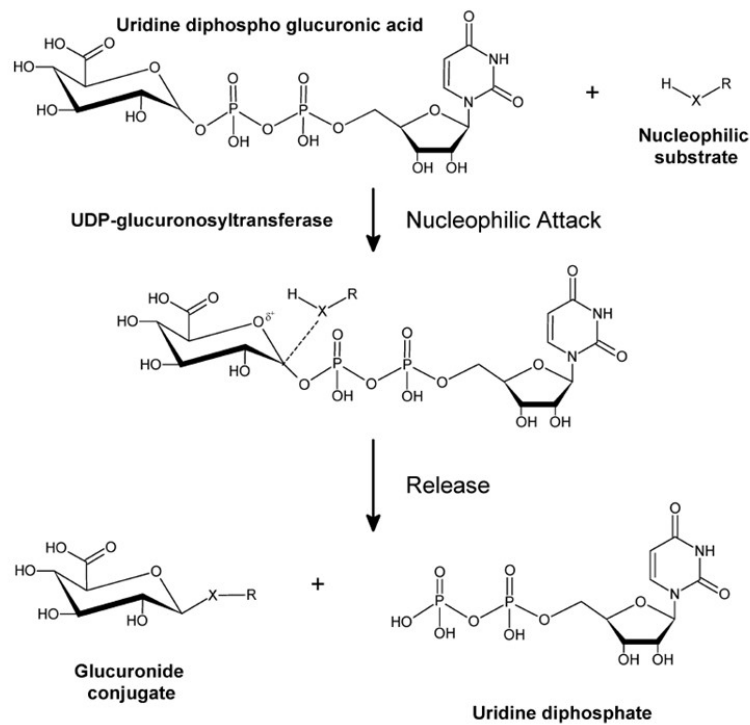


Fig. 1. Glucuronidation reaction scheme.<sup>7)</sup>

UGT は広義には UDP-glucosyltransferase スーパーファミリーを意味し、UDPGA を含む各種 UDP-sugar を補酵素として対象化合物に各種 sugar を導入する酵素群である。UDP-glucosyltransferase スーパーファミリーは 4 つのファミリー (UGT1, UGT2, UGT3 及び UGT8) に大別される。<sup>7)-9)</sup> この内、UDPGA を補酵素として要求しグルクロン酸抱合反応を触媒する狭義の UGT である UDP-glucuronosyltransferase は、UGT1 及び UGT2 ファミリーである (以降、本論文における UGT は狭義の UGT である UDP-glucuronosyltransferase を表すものとする)。UGT は肝臓、腎臓、小腸など広範な臓器中に存在しており、薬物を含む異物の代謝には UGT1A 及び UGT2B サブファミリーが大きく関わっている。これらサブファミリーにはそれぞれ多種類のアイソフォームの存在が報告されており、UGT1A サブファミリーでは UGT1A1/1A3/1A4/1A6/1A9/1A10 などが、UGT2B サブファミリーにおいては UGT2B4/2B7/2B10/2B15/2B17 などが主要なアイソフォームとして知られている。<sup>7)-10)</sup> 主要な UGT アイソフォームとそれらに対応する基質の例を Table 1 に示す。<sup>7)</sup> 例えば、UGT1A1 は神経毒性を有するビリルビンなどの内因性代謝産物だけでなく、抗がん剤イリノテカンの活性代謝物などの薬物の解毒代謝にも大きく関わっている。<sup>11)</sup>

Table 1 Major drug substrates of UGT enzymes<sup>7)</sup>

Enzyme	Substrates
UGT1A1	( <i>R</i> )-carvedilol, etoposide, $\beta$ -estradiol, ezetimibe, SN-38 (active metabolite of irinotecan)
UGT1A3	ezetimibe, telmisartan
UGT1A4	amitriptyline, lamotrigine, 1-hydroxymidazolam, olanzapine, trifluoperazine
UGT1A6	deferiprone, paracetamol
UGT1A9	entacapone, indomethacin, mycophenolic acid, ( <i>R</i> )-oxazepam, paracetamol, propofol, sorafenib
UGT2B7	( <i>S</i> )-carvedilol, codeine, diclofenac, epirubicin, flurbiprofen, morphine, naloxone, naproxen, zidovudine
UGT2B15	lorazepam, ( <i>S</i> )-oxazepam

グルクロン酸抱合におけるグルクロン酸の導入部位は、対象物質のヒドロキシ基、アミノ基又はカルボキシ基等の官能基である (まれに炭素原子にも直接導入される)。<sup>12)-14)</sup> 中でも、ヒドロキシ基へのグルクロン酸抱合が最も代表的な反応であり、その結果、エーテル結合を有する *O*-glucuronide が生成する。一方、カルボキシ基を有する薬物においては、エステル結合を有するグルクロン酸抱合体である

acyl glucuronide (AG) が生成する. 通常の *O*-glucuronide が有するエーテル結合は化学的に安定であるが, AG が有するエステル結合は化学的に不安定なことから反応性が高く, 生理的条件下の水溶液中において容易に加水分解反応や分子内アシル転移反応が進行することが知られている (Fig. 2).<sup>15)-20)</sup> AG のグルクロン酸部分のアノマー-C-1 炭素のヒドロキシ基に結合している薬物部分は, C-2 位, C-3 位及び C-4 位ヒドロキシ基へとアシル転移が順次進行し, 結果として複数の AG アイソマーが生成する. AG の加水分解反応や分子内アシル転移反応は AG の求電子的性質に基づいて生じるが, このために生体成分の一つであるタンパク質のアミノ基のような求核的な性質を有する官能基とも共有結合しうる. AG のタンパク質への共有結合メカニズムとしては, acylation 経路 (グルクロン酸部分を失いアシル転移する) 及び glycation 経路 (グルクロン酸部分を保持したままメイラード反応により共有結合する) の 2 種類の反応経路が提唱されている (Fig. 3).<sup>20)-26)</sup> 反応性 AG によって共有結合的に修飾された生体成分は, 直接的に機能的な障害を受けるだけでなく, 免疫を介した炎症反応が引き起こされ毒性発現につながると考えられている (ハプテン仮説).<sup>16),18),20)</sup>

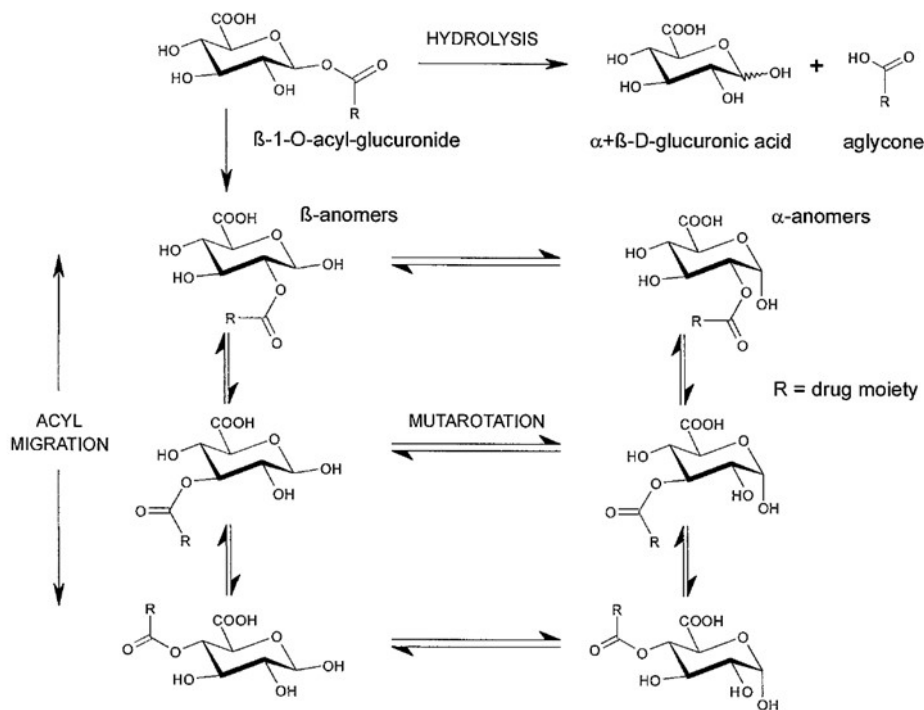


Fig. 2. Various chemical reaction pathways of AGs in aqueous solution (R = xenobiotic moiety).<sup>17)</sup>

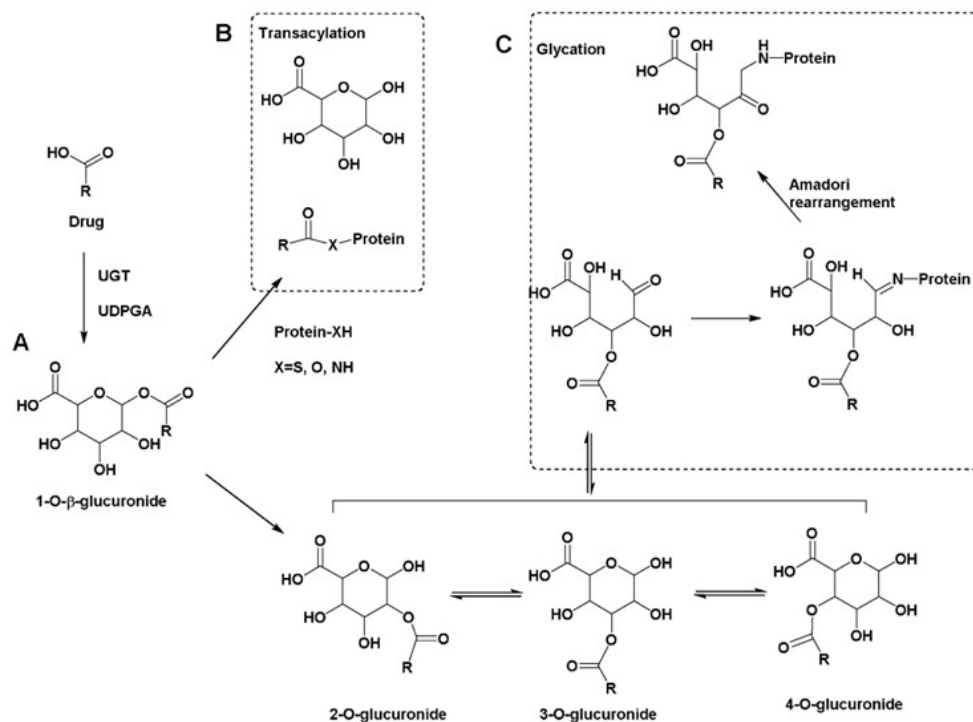


Fig. 3. Bioactivation pathways of drugs *via* protein binding of their AGs (R = xenobiotic moiety).<sup>20)</sup>

グルクロン酸抱合により AG に代謝される薬物としては、非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) のようなカルボキシ基を有する薬物が知られている。いくつかの NSAIDs (zomepirac, ibufenac 及び bromfenac 等) が肝障害やアナフィラキシー等の重篤な副作用発現により市場から撤退しているが、その原因としてグルクロン酸抱合を介した代謝的活性化, すなわち反応性代謝物 AG の関与が示唆されている。<sup>16),18),27)-29)</sup> Zomepirac, tolmetin 及び diclofenac 等の NSAIDs では, 生成した反応性 AG がタンパク質へ共有結合することが報告されている。<sup>21)-26)</sup> しかしながら, 全てのカルボキシ基を有する薬物が重篤な副作用を発現するわけではなく, その詳細なメカニズムは依然として不明なままである。2008 年にアメリカ食品医薬品局 (U.S. Food and Drug Administration, FDA) から発出された薬物代謝物の安全性評価に関するガイダンス ("Metabolites in Safety Testing" (MIST) guidance) において, 「第 2 相抱合代謝は薬物の水溶性を高めるため一般的に安全性面の懸念は小さいが, AG のような "a toxic compound (毒性物質)" では追加の安全性評価が必要である」という趣旨の内容が記載されている (なお, 同ガイダンスは 2020 年に改訂され, revision 2 となっている)。<sup>30)</sup> このことから分かるように, 医薬品開発における反応性代謝物 AG の安全性評価の重要性は極めて高い。



AGの反応性評価については、一般的に加水分解法の報告が多くなされている。上述したように、反応性AGは水溶液中にて容易に加水分解を受けることから、生理的条件下(pH 7.4)の水溶液中における加水分解反応の半減期(あるいは反応速度定数)を指標としてその反応性を評価するものである。Zomepiracやtolmetinなど毒性リスクの高い薬物のAGでは、加水分解半減期が短い(それぞれ0.45及び0.26時間)傾向が認められる。<sup>16),17),19)</sup> また、加水分解半減期だけでは毒性予測の精度が低いものの、これに加えて、分子内アシル転移反応の程度、すなわち、AGアイソマーの生成割合を考慮することにより予測精度が高まるとの報告もある。<sup>31)</sup> ただし、いずれの方法も評価のためにはAG合成標品を必要とするが、医薬品開発の早期である創薬段階において、数多くの創薬化合物に対してそれぞれのAG標品を合成することは難しい。さらにAGを合成したとしても、標品であるAGそのものが不安定なため取り扱いに注意を要し、定量結果の信頼性も乏しい。したがって、創薬段階において、創薬化合物由来のAGの反応性を評価することは困難な状況にある。創薬スクリーニング試験として、グルクロン酸抱合を介した代謝的活性化を評価するための簡便でスループロット性の高い評価方法が望まれる。

これまで多くの医薬品が肝障害やアナフィラキシー等の重篤な副作用により市場から撤退してきたが、臨床における医薬品の重篤な副作用をその開発段階から予測することは依然として困難である。例えば、troglitazoneやacetaminophenといった薬物は薬剤性肝障害(drug-induced liver injury, DILI)を引き起こすことが知られているが、これにはCYP等の代謝酵素による代謝的活性化、すなわち、薬物の代謝過程で生成する不安定な反応性中間体(反応性代謝物)の関与が示唆されている。<sup>32)-39)</sup> 生成した不安定な反応性代謝物は生体のタンパク質やDNAと共有結合することにより毒性発現を引き起こすと考えられている。中でも、医薬品の開発段階では見つけることができなかったにも関わらず、上市されて初めて稀に発現してしまうような重篤な副作用があり、特異体質性薬物毒性(idiosyncratic drug toxicity, IDT)と呼ばれる。IDTを早期に予測することは医薬品開発において重要な課題となっている。したがって、医薬品開発早期の創薬段階において、医薬品候補化合物の代謝的活性化に関わっている反応性代謝物を検出し評価することは、医薬品の予期せぬ市場撤退を未然に防ぎ、創薬の成功確率を高めるために重要であると考えられる。しかしながら、反応性代謝物それ自身は不安定なため安定的に測定することは難しい。そこで、不安定な反応性代謝物をGSHのようなトラッピング試薬を用いて捕捉することにより、安定な付加体として検出する方法、いわゆる*in vitro*トラッピングアッセイが一般的に行われている。<sup>40)-43)</sup> 酵素源としてはヒト肝ミクロソームが汎用されるが、とりわけ、CYPによる酸化代謝反応を介して生成する反応性代謝物(キノンやエポキシドなど)を検出す

ることを目的として実施される例が多い (Fig. 4).<sup>42)</sup> しかしながら, UGT を介した代謝的活性化に関する研究においては, *in vitro* トラッピングアッセイはほとんど行われていない. そこで, 本研究では, 医薬品候補化合物のグルクロン酸抱合を介した代謝的活性化を評価することを目的として, *in vitro* トラッピングアッセイの適用可能性及び有用性について検証を行った.

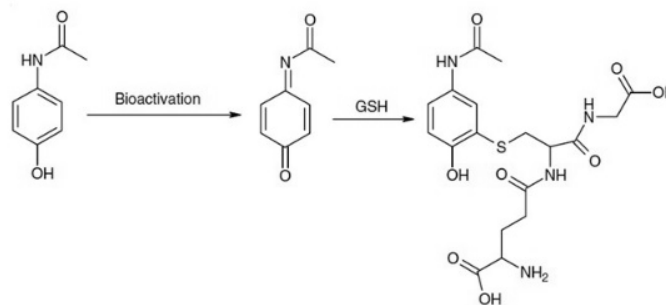


Fig. 4 GSH trapping of a quinonimine-type reactive metabolite formed by CYP-mediated oxidative reaction.<sup>42)</sup>

第 1 章では, 薬物のグルクロン酸抱合を介した代謝的活性化を検出するための最適なトラッピング試薬の探索を行い, トラッピング試薬として L-cysteine (Cys) 誘導体が有用であることを見出した経緯について述べる.

第 2 章では, トラッピング試薬として Cys を用いたトラッピングアッセイにて生成した Cys 付加体の構造推定並びに生成メカニズム推定を行った.

第 3 章では, Cys 付加体生成反応における 2 種類の反応経路 (acylation 付加及び glycation 付加) とヒト毒性リスクとの関係性について検証した.

第 4 章では, 放射性同位体 <sup>35</sup>S により標識された Cys ([<sup>35</sup>S]Cys) をトラッピング試薬として用いることにより, グルクロン酸抱合を介した代謝的活性化を定量的に評価可能な系を構築し, ヒト毒性リスクとの関係について考察した.

## 第1章 グルクロン酸抱合を介した薬物の代謝的活性化を検出するためのトラッピング試薬の探索

### 1-1 序論

医薬品開発早期の創薬段階において、IDTの原因とされる薬物の代謝的活性化、すなわち反応性代謝物の生成を評価することは、医薬品の予期せぬ市場撤退のリスクを未然に防ぎ、創薬の成功確率を高めるために重要であると考えられる。しかしながら、反応性代謝物それ自身は不安定なため安定的に検出することは難しい。そこで、GSHのようなトラッピング試薬を用いて反応性代謝物をトラップすることにより安定な付加体として検出する *in vitro* トラッピングアッセイが一般的に行われている。<sup>40)-43)</sup> 酵素源としてはヒト肝ミクロソームが汎用されるが、とりわけ、CYPによる酸化代謝反応を介して生成する反応性代謝物(キノンやエポキシドなど)を検出することを目的として実施されることが多い。一方、non-CYP代謝酵素においても、UGTによるグルクロン酸抱合を介した代謝的活性化について多くの報告がなされている。例えば、NSAIDsのようなカルボキシ基を有する薬物では、そのカルボキシ基がUGTによりグルクロン酸抱合を受け、反応性代謝物であるAGが生成し、DILI等の毒性発現に関与しているとの報告がある。<sup>18),27),28)</sup> しかしながら、UGTを介した代謝的活性化に関する研究において、*in vitro* トラッピングアッセイはほとんど行われていない。そこで本章では、グルクロン酸抱合を介した医薬品の代謝的活性化を検出することを目的として *in vitro* トラッピングアッセイを実施し、その適用可能性を検証するとともに、種々のトラッピング試薬を用いて検討を行った。

### 1-2 実験

#### 1-2-1 試薬

Diclofenac sodium, UDPGA, GSH, NAC, Cys, L-cysteinyl-glycine (CG), N-L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteine ( $\gamma$ -GC) 及び S-methyl-L-cysteine (S-Me-Cys) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。アセトニトリル (HPLC 用) 及び蒸留水 (HPLC 用) は関東化学 (Tokyo, Japan) から購入した。酵素源であるプールヒト肝ミクロソームは XenoTech (Lenexa, Kansas, TX, USA) から購入した。その他の試薬は、入手可能な最も高い品質の試薬を購入し使用した。

#### 1-2-2 試薬の調製

Diclofenac sodium 3.2 mg をアセトニトリル/蒸留水 (1,1, v/v) 混液 1 mL に溶解して、10 mM diclofenac 溶液を調製した。UDPGA 31.6 mg を蒸留水 1 mL に溶解して、

50 mM UDPGA 溶液を調製した(用時調製). GSH, NAC, Cys, CG,  $\gamma$ -GC 及び S-Me-Cys のそれぞれ 15.4, 8.2, 6.1, 8.9, 12.5 及び 6.8 mg を蒸留水 1 mL に溶解して, 50 mM GSH, NAC, Cys, CG,  $\gamma$ -GC 及び S-Me-Cys 溶液を調製した(用時調製).  $K_2HPO_4$  及び  $KH_2HPO_4$  のそれぞれ 3.48 及び 2.72 g を蒸留水 100 mL に溶解して 200 mM  $K_2HPO_4$  及び  $KH_2HPO_4$  溶液を調製した. 200 mM  $K_2HPO_4$  溶液及び 200 mM  $KH_2HPO_4$  溶液を混合して, pH を 7.4 に調整し, 200 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を調製した. 酢酸アンモニウム 0.77 g を蒸留水 1 L に溶解して 10 mM 酢酸アンモニウム溶液を調製した. 10 mM 酢酸アンモニウム溶液に酢酸を添加して, pH を 5.0 に調整し, 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0) を調製した.

### 1-2-3 GSH/NAC トラッピングアッセイ

反応溶液 (計 200  $\mu$ L/tube) を下記の組成にて調製した: 100  $\mu$ M 評価化合物 (diclofenac), 1.0 mg protein/mL ヒト肝ミクロソーム, 5 mM UDPGA, 5 mM トラッピング試薬 (GSH 又は NAC) 及び 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4). 反応溶液を 37°C で 60 分間インキュベーション後, アセトニトリル 800  $\mu$ L を添加し反応停止した. 反応停止後の混液を遠心分離 (10,000 g, 4°C, 5 分間) した後, 得られた上清の全量を採取し, 窒素気流下室温にて蒸発乾固した. 蒸発乾固後の残渣を 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0) /アセトニトリル (1,9, v/v) 混液 100  $\mu$ L に再溶解し, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) により測定した.

### 1-2-4 LC-MS/MS 測定

LC 分析は, Hitachi L-7000 series HPLC システム (Hitachi, Tokyo, Japan) を使用し, 以下の分析条件にて実施した.

- Column : Luna C8(2) (5  $\mu$ m, 2  $\times$  150 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- Mobile phase A : 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0)
- Mobile phase B : アセトニトリル
- Gradient :

Time (min)	0	5	40	45	45.1	50
%B	10	10	70	70	10	10

- Flow rate : 0.2 mL/min
- Column temperature : 40°C
- Temperature in an autoinjector : 4°C
- Injection volume : 20  $\mu$ L

MS 分析は、トリプル四重極型質量分析計 TSQ7000(ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) を使用し、以下の分析条件にて実施した。Q1 full scan 測定により MS 測定を行った後、Product ion scan 測定により tandem mass spectrometry (MS/MS) 測定を行った。

- Ionization : Electro-spray ionization (ESI)
- Spray voltage : 4.5 kV
- Nitrogen sheath gas : 70 psi
- Auxiliary gas : 5 units
- Capillary temperature : 250°C
- Q1 full scan :  $m/z$  200 to 700 in positive and negative ion mode
- Product ion scan :
  - $m/z$  296 [M+H]<sup>+</sup> in positive ion mode (for diclofenac)
  - $m/z$  441 [M+H]<sup>+</sup> in positive ion mode (for diclofenac NAC adduct)
- Collision gas pressure : 2 mTorr (argon)
- Collision energy : 35 eV

#### 1-2-5 Cys 誘導体トラッピングアッセイ

反応溶液（計 100  $\mu$ L/tube）を下記の組成にて調製した：100  $\mu$ M 評価化合物 (diclofenac), 1.0 mg protein/mL ヒト肝ミクロソーム, 5 mM UDPGA, 5 mM トラッピング試薬 (Cys, GSH, NAC, CG,  $\gamma$ -GC 又は S-Me-Cys) 及び 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)。なお、反応溶液に含まれるアセトニトリルの濃度は 0.5% (v/v) とした。反応溶液を 37°C で 60 分間インキュベーション後、アセトニトリル 100  $\mu$ L を添加し反応停止した。反応停止後の混液を遠心分離 (10,000 g, 4°C, 5 分間) し、遠心分離後の上清を LC-photodiode array (PDA) /MS により測定した。

#### 1-2-6 LC-PDA/MS 測定

LC 分析は、ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) システム Acquity ultra-performance liquid chromatography (UPLC) (Waters, Milford, MA, USA) を使用し、以下の分析条件にて実施した。

- Column : Acquity UPLC BEH C18, 1.7  $\mu$ m, 2.1  $\times$  50 mm (Waters)
- Mobile phase A : 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0)
- Mobile phase B : アセトニトリル
- Gradient :

Time (min)	0	3	13	16	16.1	20
%B	15	15	60	60	15	15

- Flow rate : 0.2 mL/min
- Column temperature : 40°C
- Temperature in an autoinjector : 4°C
- Injection volume : 20 µL
- PDA detector : 200 to 400 nm

MS 分析は, quadrupole time-of-flight mass spectrometry (QTof) 型質量分析計 Xevo G2 QTof (Waters) を使用し, 以下の分析条件にて実施した. なお, 質量分析計は PDA 検出器の直後に直列に接続した.

- Ionization : electro-spray ionization (ESI)
- Capillary voltage : 3.0 kV
- Sampling cone voltage : 20 V
- Extraction cone voltage : 3.0 V
- Source temperature : 120°C
- Desolvation temperature : 350°C
- Cone gas : 50 L/h
- Desolvation gas : 800 L/h
- Q1 full scan :  $m/z$  200 to 800 in positive ion mode
- MS resolution : more than 20,000 (full width at half maximum, FWHM) in resolution mode
- Accurate mass calibration : sodium formate
- Accurate mass correction using a lockspray device : leucine (Leu)-enkephalin

### 1-3 結果及び考察

#### 1-3-1 一般的なトラッピング試薬を用いた *in vitro* トラッピングアッセイ

評価化合物として添付文書にて肝障害の発症が警告されている NSAID である diclofenac を, トラッピング試薬として GSH 及び NAC を選択して (Fig. 5), *in vitro* トラッピングアッセイを行った. まず, トラッピング試薬として最も汎用される GSH を用いて評価を行い, LC-MS/MS により付加体の検出を試みた. MS 分析 (Q1 full scan) の結果, positive ion mode 及び negative ion mode のいずれにおいても diclofenac の GSH 付加体に相当するイオンは検出されなかった (data not shown). したがって, GSH ト

ラッピングアッセイにより UGT を介した代謝的活性化を評価することは困難であると考えられた。GSH 付加体が検出されない原因として、GSH は反応性代謝物 AG との反応性に乏しい、あるいは、GSH 付加体は生成するが不安定である、等の可能性が推察された。

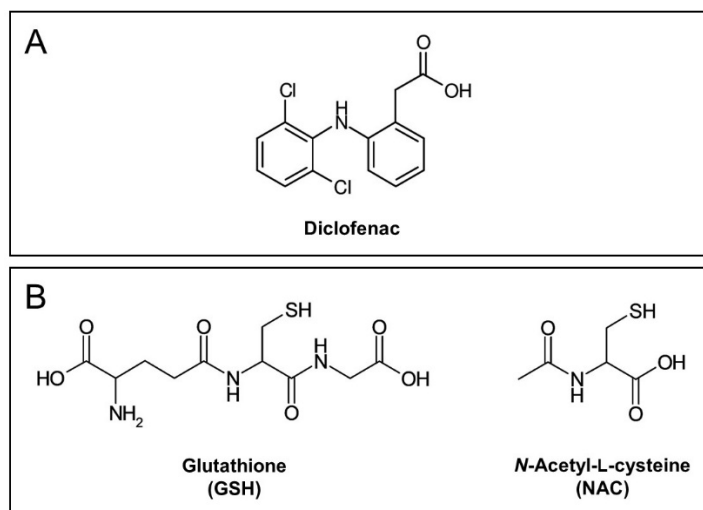


Fig. 5 Structures of (A) test drug (diclofenac) and (B) trapping agents (GSH and NAC).

GSH 以外のトラッピング試薬としては、GSH の報告数には及ばないものの NAC の報告もある。<sup>40),43)</sup> そこで、NAC をトラッピング試薬として用いて同様の条件でトラッピングアッセイを行った。MS 分析 (Q1 full scan) の結果、positive ion mode において diclofenac の NAC 付加体に相当するイオン (D1) が  $m/z$  441 ( $[M+H]^+$ ) にて検出された (Fig. 6)。D1 イオンは UDPGA 単独 (Fig. 6 (A)) あるいは NAC 単独 (Fig. 6 (B)) ではいずれも生成しなかったものの、UDPGA と NAC を共存させた時にのみ生成したことから (Fig. 6 (C))、未変化体自体は NAC にトラップされないが、UGT による代謝的活性化の結果として生成した反応性代謝物が NAC によりトラップされたと考えられた。D1 イオンは、diclofenac ( $m/z$  296) に比して +145 の mass shift (NAC 部分) を示し、MS/MS 分析 (product ion scan) により diclofenac の化学構造に特徴的なマスフラグメンテーションパターン ( $m/z$  278, 250 及び 215) を示したことから、diclofenac の NAC 付加体に相当する構造を有することが支持された (Fig. 6 (D) and (E))。また、NAC では、アミノ基がアセチル基により保護されているため、diclofenac との結合部位はチオール基であると推定された。

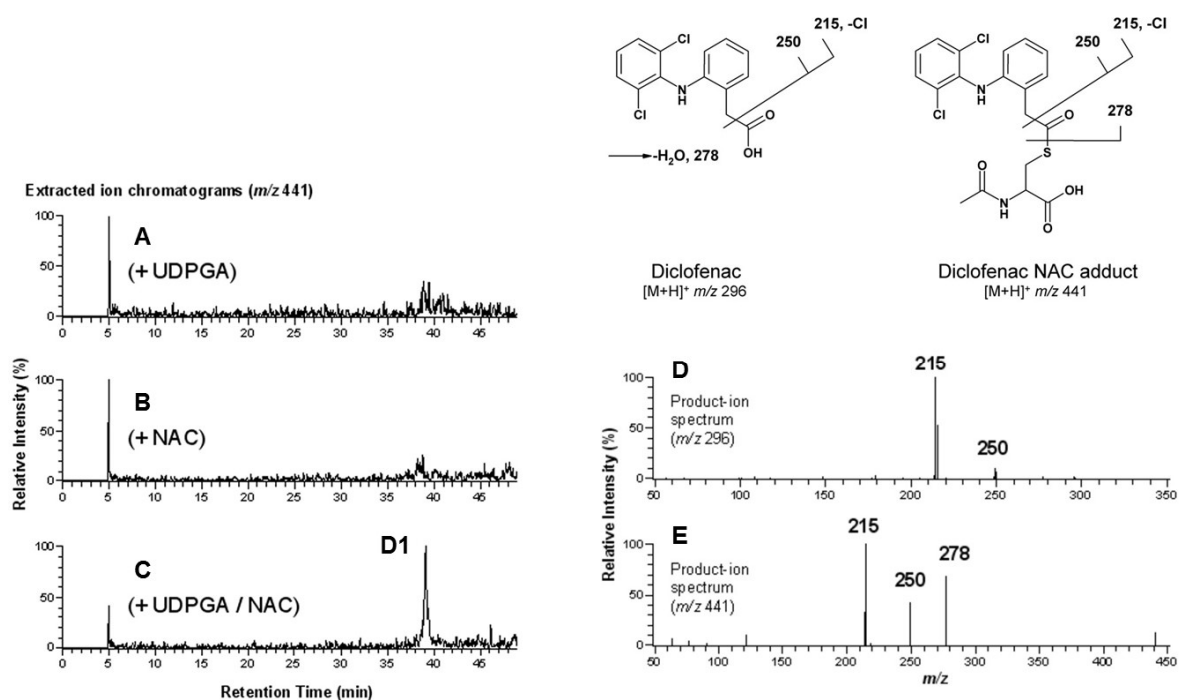


Fig. 6 MS data of diclofenac NAC adduct (D1): extracted ion mass chromatograms (in positive ion full scan mode) of diclofenac NAC adduct at  $m/z$  441 in human liver microsomal incubations (A) with UDPGA, (B) with NAC, and (C) with UDPGA/NAC, and MS/MS product-ion spectra of (D) diclofenac at  $m/z$  296 and (E) diclofenac NAC adduct at  $m/z$  441.

AG はグルクロン酸のアノマーC-1 炭素のヒドロキシ基に薬物のカルボキシ基が結合した活性エステルである。NAC トラッピングアッセイにおいて、NAC のチオール基が活性エステルである AG のカルボニル基を求核的に攻撃することで、グルクロン酸から NAC への O- to S-アシル転移反応が生じ、チオエステル結合を介した NAC 付加体が生成すると推定された (Fig. 7)。チオエステルは AG のオキシエステルと同様に活性エステルであることから、水溶液中で不安定であり、加水分解を受けやすいと考えられる。したがって、GSH トラッピングアッセイにおいては、チオエステル結合を有する GSH 付加体が生成するものの、加水分解によって消失し、結果として GSH 付加体を検出することができないものと推察された。しかしながら、GSH 付加体及び NAC 付加体は両者ともに不安定なチオエステル体であるにも関わらず、前者は未検出であり、後者は検出可能という異なる測定結果を生じた。この違いは、付加体の生成速度あるいは分解速度のどちらかに起因するものと考えられた。GSH 及び NAC のチオール基の  $pK_a$  を比較するとそれぞれ 8.83 及び 9.52 であり、NAC の  $pK_a$  は GSH



のそれより高値であることが知られている。<sup>44)</sup> すなわち、pH7.4の水溶液中においては、両者ともに主として非解離型として存在するが、NACの方がGSHより非解離型のチオール基の存在割合が高いと考えられる。トラッピング反応においては、解離型のチオレートアニオンが求核的にエステルのカルボニル炭素にアタックし、アシル転移によりエステル体が生成すると考えられる。したがって、GSHより非解離型の存在割合が低いNACは、付加体生成速度の面ではGSHより不利であると考えられる。このため、前述の違いは生成速度というよりはむしろ分解速度に起因する可能性が高いと考えられた。すなわち、GSH付加体よりNAC付加体の方が安定であるために本評価系においてはNAC付加体が検出可能だったものと考えられた。

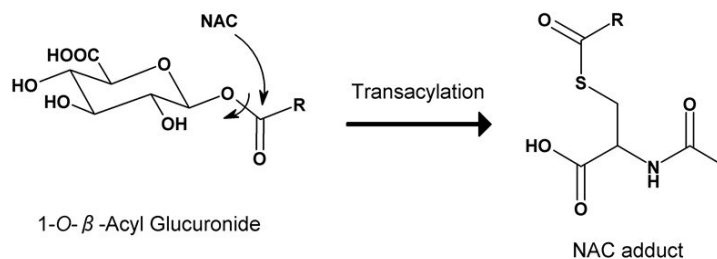


Fig. 7 Proposed reaction pathway of NAC adduct production (R = xenobiotic moiety).

以上の結果より、生成するNAC付加体をLC-MSにて検出することができたことから、UGTを介した代謝的活性化をトラッピングアッセイにより評価できる可能性を示すことができた。

なお、UDPGA添加時の反応溶液中に、反応性代謝物であるdiclofenac AGが生成されていることを確認した (Fig. 8)。Diclofenac AGはいずれも複数ピークとして検出され、既報<sup>15)-20)</sup>通り、分子内アシル転移により異性体を生じた結果と考えられた。Diclofenac AGはそれぞれ  $m/z$  472 ( $[M+H]^+$ ) にて検出され、diclofenac ( $m/z$  296,  $[M+H]^+$ ) に比して、+176のmass shift (glucuronic acid部分)を示した。

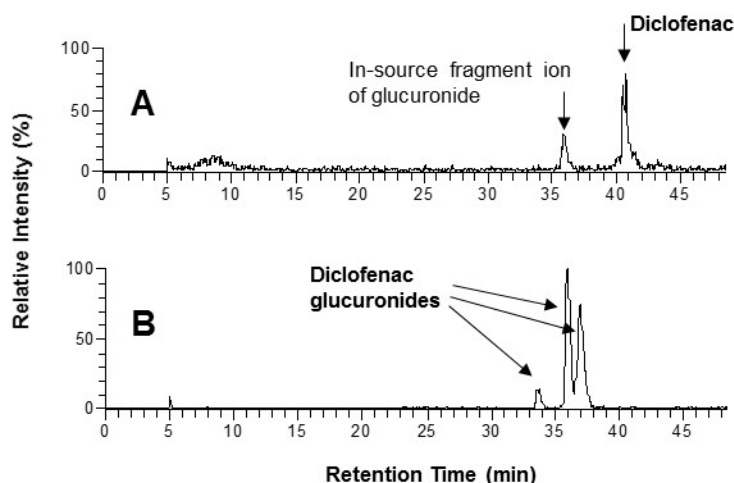


Fig. 8 Extracted ion mass chromatograms (in positive ion full scan mode) of (A) diclofenac at  $m/z$  296 and (B) diclofenac AGs at  $m/z$  472 in human liver microsomal incubations with UDPGA and NAC.

### 1-3-2 各種 L-cysteine (Cys) 誘導体を用いたトラッピングアッセイ

一般的なトラッピング試薬である GSH 及び NAC はいずれも Cys 誘導体であり、反応性代謝物をトラップするチオール基を有することを特徴としている。そこで、UGT を介した代謝的活性化を評価するにあたって、より最適なトラッピング試薬を探索することを目的として、6 種の Cys 誘導体 (Fig. 9) について比較検討を行った。GSH は L-glutamic acid (Glu)、Cys 及び L-glycine (Gly) の 3 アミノ酸からなるトリペプチドであり、NAC は Cys のアミノ基がアセチル基により保護されたものである。GSH の末端アミノ酸 (Glu あるいは Gly) を一つ外したジペプチド型の Cys 誘導体として Cys-Gly (CG) 及び  $\gamma$ -Glu-Cys ( $\gamma$ -GC) を選択した。Cys のチオール基が保護された Cys 誘導体として S-methyl Cys (S-Me-Cys) を選択した。また、評価化合物として diclofenac を用いた。

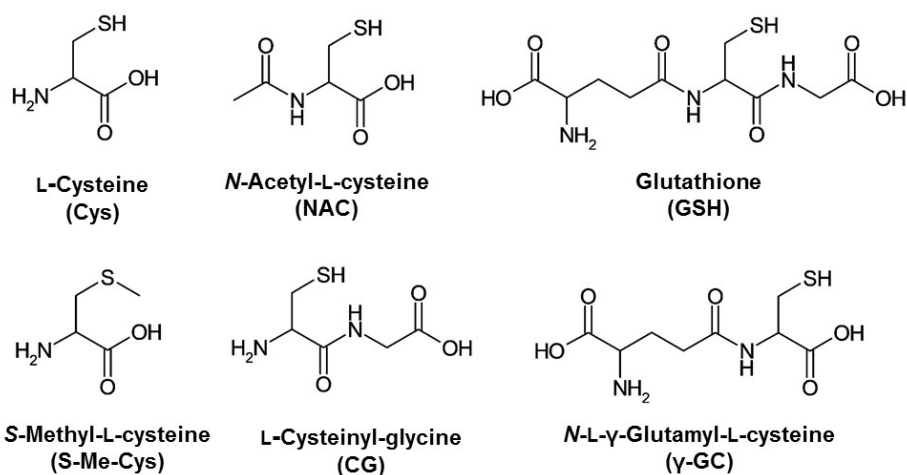


Fig. 9 Structures of various cysteine derivatives (Cys, NAC, GSH, S-Me-Cys, CG, and  $\gamma$ -GC).

UDPGA 及び各種 Cys 誘導体の存在下，評価化合物をヒト肝ミクロソーム中にてインキュベーションし，インキュベーション後のサンプルを PDA (UV) 検出器及び質量分析計を備えた LC (LC-PDA/MS) により分析した．各種 Cys 誘導体の存在下，diclofenac を評価化合物としてトラッピングアッセイを行った時の PDA (UV) 測定結果を Fig. 10 に示す．UV クロマトグラム (225 nm) において，Cys あるいは CG をトラッピング試薬として用いた場合においてのみ diclofenac の付加体ピーク（それぞれ D2 あるいは D3）が検出された．一方，その他の Cys 誘導体では，付加体ピークは検出されなかった．前述したように，高感度な MS 分析においては，GSH 付加体は未検出であり，一方，NAC 付加体は検出可能であったもののそのピーク強度は高いものではなかった．Cys 付加体及び CG 付加体については，より低感度で汎用性の高い UV 検出においてもピーク検出可能であったことから，GSH 付加体や NAC 付加体に比して生成量が明らかに高いことが示された．

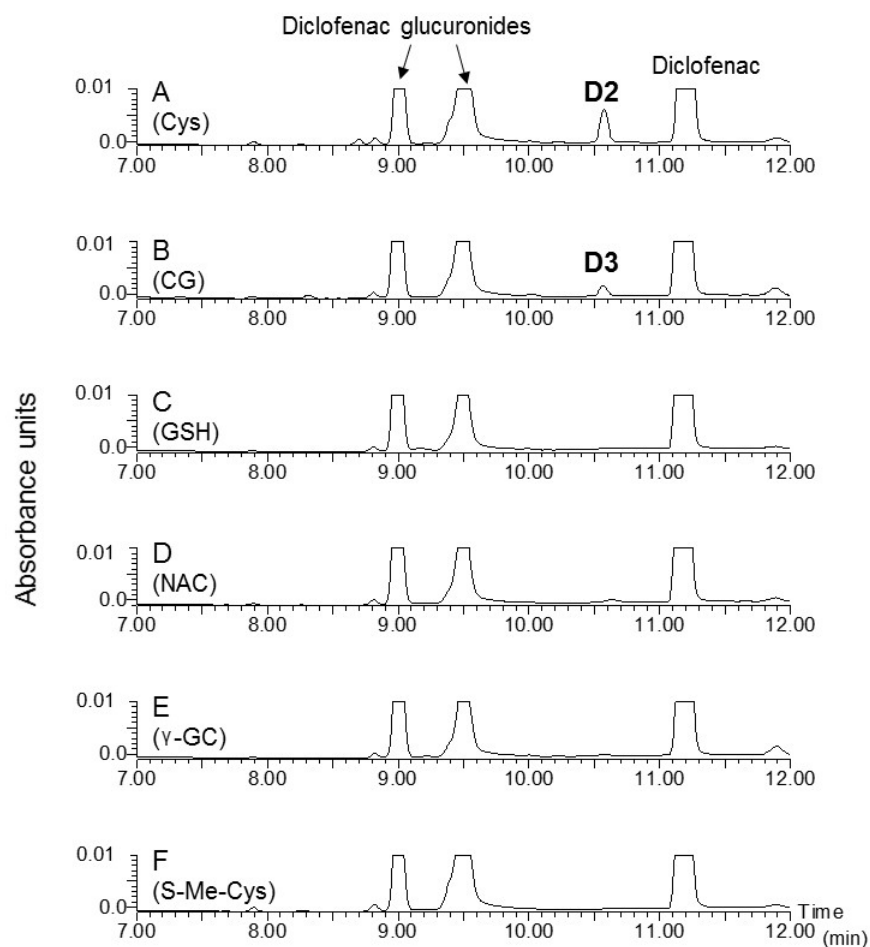


Fig. 10 UHPLC-PDA-UV chromatograms (at 225 nm) of human liver microsomal incubations of diclofenac with UDPGA and Cys derivatives (A: Cys, B: CG, C: GSH, D: NAC, E:  $\gamma$ -GC, and F: S-Me-Cys).

以上、Cys をトラッピング試薬として用いた場合に最もピーク強度の高い付加体が得られた。添付文書にて肝障害の発症が警告されている diclofenac において、UDPGA 依存的に Cys 付加体が生成したことから、Cys をトラッピング試薬として用いることにより、UGT を介した代謝的活性化によるヒト肝毒性リスクを評価できる可能性が示された。

#### 1-4 小括

グルクロン酸抱合を介した代謝的活性化を評価するためのトラッピング試薬を探索することを目的として、種々のトラッピング試薬を用いた *in vitro* トラッピングアッセイを実施した。

一般的によく使用されているトラッピング試薬である GSH を用いた結果, diclofenac の GSH 付加体は MS 分析において検出されなかった。UGT を介した代謝的活性化の評価において GSH トラッピングアッセイの報告例がない原因はこのためであることが推察された。また, GSH 付加体が検出されない原因として, 生成した GSH 付加体が不安定である可能性が推察された。次に, トラッピング試薬として NAC を用いた結果, ピーク強度が低いながらも diclofenac の NAC 付加体を MS 分析にて検出することができた。この NAC 付加体は UDPGA 依存的に生成したことから, UGT を介した代謝的活性化をトラッピングアッセイにより評価できる可能性を見出すことができた。

続いて, より有用なトラッピング試薬を探索することを目的として, GSH や NAC に加えて各種 Cys 誘導体 (Cys, CG,  $\gamma$ -GC 及び S-Me-Cys) を用いて検討した。PDA 測定の結果 (UV 225 nm), Cys と CG を用いた時のみ diclofenac の付加体ピークが検出され, GSH や NAC などのその他 Cys 誘導体では付加体ピークは検出されなかった。より低感度で汎用性の高い UV 検出により付加体ピークが検出可能であったことから, UGT を介した代謝的活性化を評価するためのトラッピング試薬として, Cys や CG が極めて有用であることを見出した。

以上, Cys をトラッピング試薬として用いた場合に最もピーク強度の高い付加体が得られた。添付文書にて肝障害の発症が警告されている diclofenac において, UDPGA 依存的に Cys 付加体が生成したことから, Cys をトラッピング試薬として用いることにより, UGT を介した代謝的活性化によるヒト肝毒性リスクを評価できる可能性が示された。

## 第2章 Cys 付加体の化学構造並びに生成経路の推定

### 2-1 序論

前章にて、グルクロン酸抱合を介した代謝的活性化を評価するための最適なトラッピング試薬を探索した結果、Cys が有用であることを見出した。本章では、精密質量分析における MS フラグメント解析及び還元剤を用いた化学的アプローチに基づいて、Cys 付加体の構造推定を行った。

### 2-2 実験

#### 2-2-1 試薬

Diclofenac sodium, UDPGA, Cys, CG, dithiothreitol (DTT) 及び alamethicin は Sigma-Aldrich から購入した。アセトニトリル (HPLC 用) 及び蒸留水 (HPLC 用) は関東化学から購入した。プールヒト肝ミクロソームは XenoTech から購入した。その他の試薬は、入手可能な最も高い品質の試薬を購入し使用した。

#### 2-2-2 試薬の調製

Diclofenac sodium 3.2 mg をアセトニトリル/蒸留水 (1,1, v/v) 混液 1 mL に溶解して、10 mM diclofenac 溶液を調製した。UDPGA 31.6 mg を蒸留水 1 mL に溶解して、50 mM UDPGA 溶液を調製した (用時調製)。Cys 及び CG のそれぞれ 6.1 及び 8.9 mg を蒸留水 1 mL に溶解して、50 mM Cys 及び CG 溶液を調製した (用時調製)。DTT 16.5 mg をアセトニトリル/蒸留水 (1,1, v/v) 混液 1 mL に溶解して、100 mM DTT 溶液を調製した (用時調製)。Alamethicin 5.0 mg をメタノール 200  $\mu$ L に溶解した後、蒸留水にて 100 倍希釈し、250  $\mu$ g/mL alamethicin 溶液を調製した。MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.51 mg を蒸留水 50 mL に溶解して、50 mM MgCl<sub>2</sub> を調製した。K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 及び KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> のそれぞれ 3.48 及び 2.72 g を蒸留水 100 mL に溶解して 200 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 及び KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液を調製した。200 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液及び 200 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液を混合して、pH を 7.4 に調整し、200 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を調製した。酢酸アンモニウム 0.77 g を蒸留水 1 L に溶解して 10 mM 酢酸アンモニウム溶液を調製した。10 mM 酢酸アンモニウム溶液に酢酸を添加して、pH を 5.0 に調整し、10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0) を調製した。

#### 2-2-3 Cys トラッピングアッセイ (Cys 付加体の構造推定)

反応溶液 (計 100  $\mu$ L/tube) を下記の組成にて調製した: 100  $\mu$ M diclofenac, 1.0 mg protein/mL ヒト肝ミクロソーム, 5 mM UDPGA, 5 mM Cys (又は CG) 及び 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)。反応溶液を 37°C で 60 分間インキュベーション後、アセト

ニトリル 100  $\mu\text{L}$  を添加し反応停止した。反応停止後の混液を遠心分離 (10,000 g, 4°C, 5 分間) した。遠心分離後の上清を LC-PDA/MS により測定した。測定後のサンプルを、オートサンプラー内 (4°C) にて放置し、24 及び 48 時間経過後に再測定した。48 時間経過後に再測定したサンプルの 100  $\mu\text{L}$  を採取し、100 mM DTT 5 $\mu\text{L}$  を添加して混和後、同様に測定した。

#### 2-2-4 LC-PDA/MS 測定

LC 分析は、UHPLC システム Acquity UPLC を使用し、以下の分析条件にて実施した。

- Column : Acquity UPLC BEH C18 (1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$  50 mm)
- Mobile phase A : 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0)
- Mobile phase B : アセトニトリル
- Gradient :

Time (min)	0	3	13	16	16.1	20
%B	15	15	60	60	15	15

- Flow rate : 0.2 mL/min
- Column temperature : 40°C
- Temperature in an autoinjector : 4°C
- Injection volume : 20  $\mu\text{L}$
- PDA detector : 200 to 400 nm

MS 分析は、QToF 型質量分析計 Xevo G2 QToF を使用し、以下の分析条件にて精密質量を測定した。MS<sup>E</sup> (MS/MS acquisition at elevated collision energy) scan 測定により MS/MS 測定を行った (MS<sup>E</sup> scan mode では、MS/MS 測定における collision energy の設定値を一定に固定することなく、変動させて測定することにより、種々のフラグメントイオンを効率的かつ網羅的に取得することができる)。なお、質量分析計は PDA 検出器の直後に直列に接続した。

- Ionization : electro-spray ionization (ESI)
- Capillary voltage : 3.0 kV
- Sampling cone voltage : 20 V
- Extraction cone voltage : 3.0 V
- Source temperature : 120°C

- Desolvation temperature : 350°C
- Cone gas : 50 L/h
- Desolvation gas : 800 L/h
- MS<sup>E</sup> scan :  $m/z$  200 to 800 in positive and negative ion mode
- Collision energy : 6 eV (low) and 15–35 eV (high)
- MS resolution : more than 20,000 (FWHM) in resolution mode
- Accurate mass calibration : sodium formate
- Accurate mass correction using a lockspray device : Leu-enkephalin

## 2-3 結果及び考察

### 2-3-1 Diclofenac Cys 付加体の構造推定

前章にて示した通り，diclofenac について Cys トラッピングアッセイを実施した結果，diclofenac の Cys 付加体と推定されるピーク (D2) が生成した (Fig. 11 (A)). この時の測定サンプルを HPLC のオートサンプラー中 (4°C) にて静置保存し，24 時間経過後に再測定したところ，D2 ピークが減少し，代わりに新たなピーク (D4) が出現した (Fig. 11 (B)). 48 時間経過後では，D2 ピークは完全に消失した (Fig. 11 (C)). このサンプルに還元剤 DTT を添加して再測定したところ，D4 ピークが消失し，再度 D2 ピークが出現した (Fig. 11 (D)). したがって，D2 が経時的に空気酸化されることにより酸化体 D4 に変換され，この D4 は DTT の還元作用により D2 に再変換されると考えられた. 以上の結果より，D2 では Cys 部分のチオール基はフリーの状態で存在していると考えられることから，Cys の結合部位はアミノ基であると推定された.

D2 を精密質量分析した結果を Fig. 12 に示す. D2 イオンは  $m/z$  399.0336 ( $[M+H]^+$ ) にて検出され，diclofenac ( $m/z$  296.0248,  $[M+H]^+$ ) に比して +103.0088 Da の mass shift (Cys 部分) を示した (Fig. 12 (C) and (F)). D2 イオンは，反応溶液に UDPGA と Cys を共存させた時にのみ生成することから，UGT による代謝的活性化の結果として生成した反応性代謝物が Cys によりトラップされたものであることが確認できた. また，MS<sup>E</sup> 分析により，D2 は diclofenac の化学構造に特徴的なマスフラグメンテーションパターン ( $m/z$  250.0193, 215.0504 及び 214.0420) を示したことから，diclofenac の Cys 付加体に相当する構造を有することが支持された. D2 の酸化体である D4 は， $m/z$  518.0385 ( $[M+H]^+$ ) にて検出され，D2 に比して +119.0049 Da の mass shift (Cys 部分) を示し，D2 にさらにもう一分子の Cys が付加した構造と推定された (Fig. 12 (D) and (G)). D4 は diclofenac の化学構造に特徴的なマスフラグメンテーションパターン



( $m/z$  250.0192, 215.0503 及び 214.0434)に加えて, Cys のジスルフィド体である cystine 部分に特徴的なマスフラグメンテーションパターン ( $m/z$  241.0326 及び 151.9853) を示したことから, diclofenac の cystine 付加体 (D2 の Cys 付加体) と推定された. この精密質量分析によって得られた D2 及び D4 の推定構造は, 前述した DTT を用いた化学的アプローチの結果と矛盾が無かった.

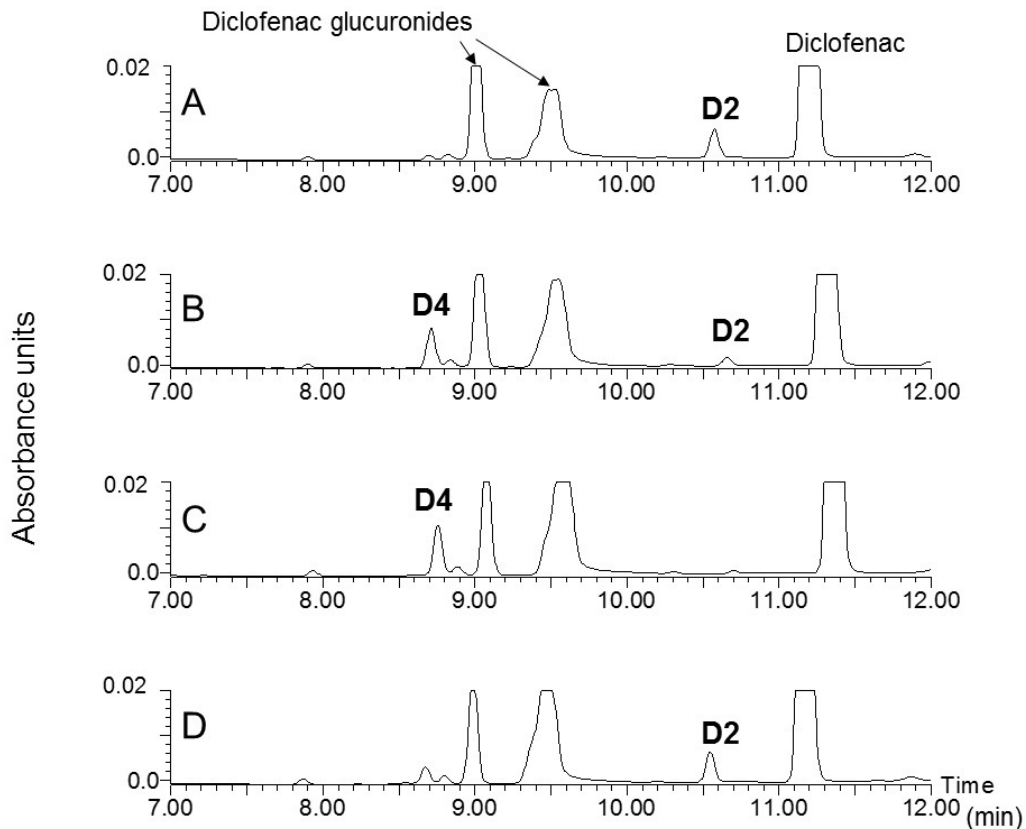


Fig. 11 UHPLC-PDA-UV chromatograms (at 225 nm) of human liver microsomal incubations of diclofenac with UDPGA and Cys. Samples were kept at 4°C and analyzed (A) just after, (B) 24 h after, and (C) 48 h after quenching incubation reaction with acetonitrile. Finally, the sample 48 h after quenching was analyzed (D) with addition of DTT.

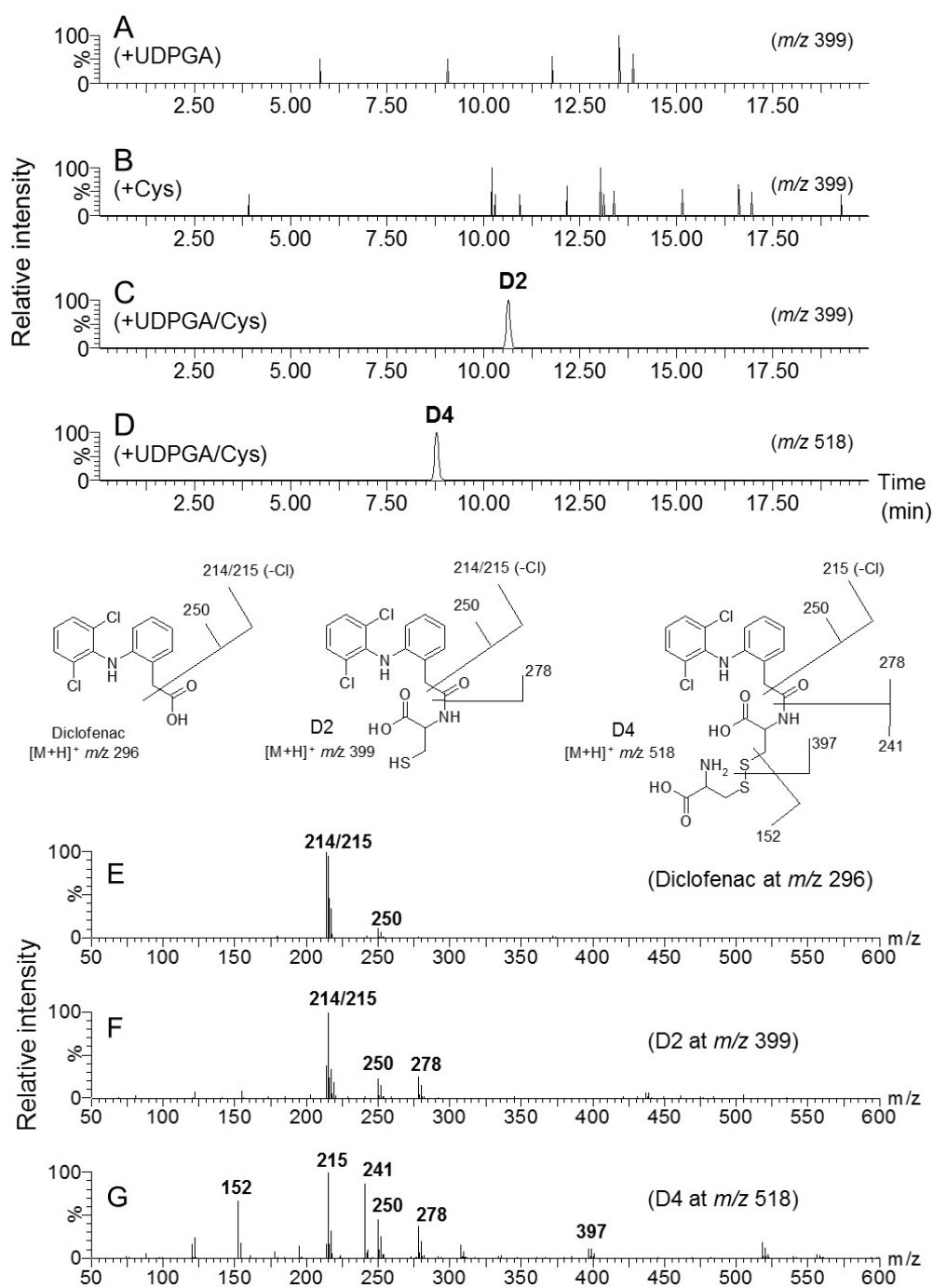


Fig. 12 UHPLC-QToFMS data of D2 and D4 in human liver microsomal incubations of diclofenac with UDPGA and Cys: extracted ion mass chromatograms (in positive ion full scan mode) (A - D) and product ion spectra (E - G). Samples were kept at 4°C and analyzed just after or 24 h (for D2 or D4, respectively) after quenching incubation reaction with acetonitrile.

### 2-3-2 Diclofenac CG 付加体の構造推定

Diclofenac の CG 付加体と推定されるピーク (D3) を精密質量分析した結果を Fig. 13 に示す. D3 イオンは  $m/z$  456.0545 ( $[M+H]^+$ ) にて検出され, diclofenac ( $m/z$  296.0248,  $[M+H]^+$ ) に比して +160.0297 Da の mass shift (CG 部分) を示した. また, MS<sup>E</sup> 分析により, D3 は diclofenac の化学構造に特徴的なマスフラグメンテーションパターン ( $m/z$  250.0196 及び 215.0507) だけでなく, CG 部分構造に特徴的なマスフラグメンテーションパターン ( $m/z$  162.0211 及び 76.0242) を示したことから, diclofenac の CG 付加体に相当する構造を有することが支持された. 以上, diclofenac の Cys 付加体 (あるいは CG 付加体) の精密質量測定の結果を Table 2 にまとめた.

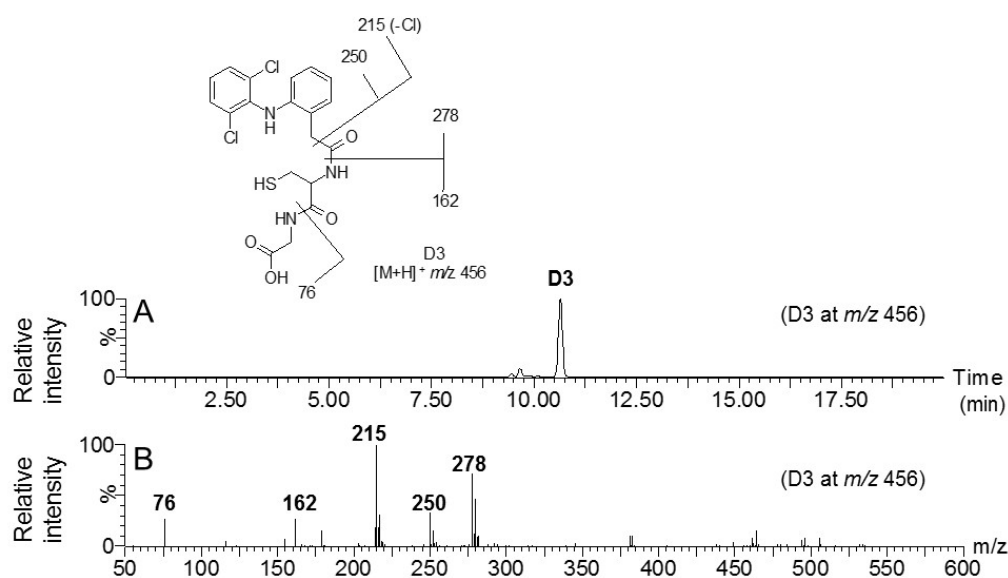


Fig. 13 UHPLC-QToFMS data of D3: extracted ion mass chromatogram (in positive ion full scan mode) (A) and product ion mass spectrum (B).

Table 2 Accurate mass data of diclofenac, ketoprofen, and their derivatives by using UHPLC-QToFMS

Compound	Ionized form	Measured mass	Calculated mass	Elemental composition
Diclofenac	$[M + H]^+$	296.0248	296.0245	$C_{14}H_{12}NO_2C_{12}$
Diclofenac glucuronide	$[M + H]^+$	472.0568	472.0566	$C_{20}H_{20}NO_8C_{12}$
D2	$[M + H]^+$	399.0336	399.0337	$C_{17}H_{17}N_2O_3SCl_2$
D3	$[M + H]^+$	456.0545	456.0552	$C_{19}H_{19}N_3O_4SCl_2$
D4	$[M + H]^+$	518.0385	518.0378	$C_{20}H_{22}N_3O_5S_2C_{12}$

### 2-3-3 Cys 付加体の生成メカニズムの推定

各種 Cys 誘導体をトラッピング試薬として用いて *in vitro* トラッピングアッセイを行った結果, Cys と CG 添加時のみ付加体ピークが検出され, これら付加体は薬物のカルボキシ基と Cys のアミノ基がアミド結合を介して結合した構造を有していると推定された. これら付加体の共通点として, N 末端 Cys のチオール基とアミノ基の両方がフリーであることが挙げられ, 付加体の生成反応にはこの両官能基の存在が必須であると推察された (Fig. 14). フリーのアミノ基を有する S-Me-Cys, GSH 及び  $\gamma$ -GC では, 付加体の生成が認められなかったことから, AG の活性エステルとアミノ基が直接反応してアミド結合を形成する反応は起こりにくいものと考えられた. なお, GSH 及び  $\gamma$ -GC については, Cys のチオール基と Glu のアミノ基とを有しているが, 付加体の生成が認められなかったことから, チオール基とアミノ基が離れている場合は本反応に関与し難いものと考えられた. また, 保護されたアミノ基とフリーのチオール基を有する NAC においては, 高感度な MS 分析では検出されたものの, 低感度な UV 分析では検出されなかったことから, その付加体生成量は低いと考えられた (Fig. 10 (D)). NAC 付加体の推定構造はチオエステル体であったことから, AG は少なくともチオール基と反応しチオエステル体を生成すると考えられた. 生成したチオエステル体は水溶液中で不安定なため生成後速やかに加水分解されるが, 分解を免れて残存したチオエステル体が検出されるものと推察された.

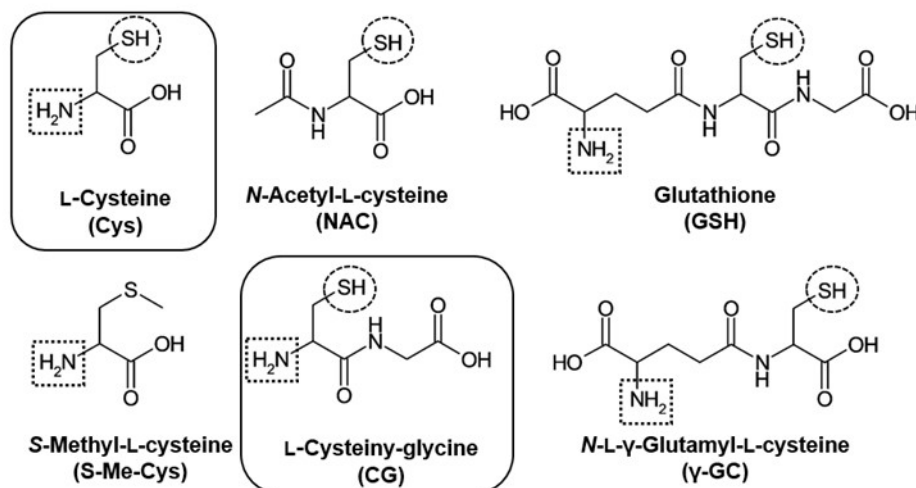


Fig. 14 Structures of Cys derivatives used as the trapping agent.

以上より，推定された Cys 付加体生成メカニズムを Fig. 15 に示す．まず，UGT によりカルボキシ基を有する薬物からエステル結合を有する AG が生成する．次に，AG の活性エステル結合に Cys のチオール基がアタックして O- to S-アシル転移が起き，チオエステル結合を有する S-アシル Cys 付加体が生成する．さらに，この反応性の高いチオエステル結合に対して，Cys のアミノ基がアタックして，分子内 S- to N-アシル転移が生じ，アミド結合を有する N-アシル Cys 付加体が生成する．また，この Cys アミド付加体は，チオール基がフリーであるため，酸化により別の Cys 分子とジスルフィド体を形成する．

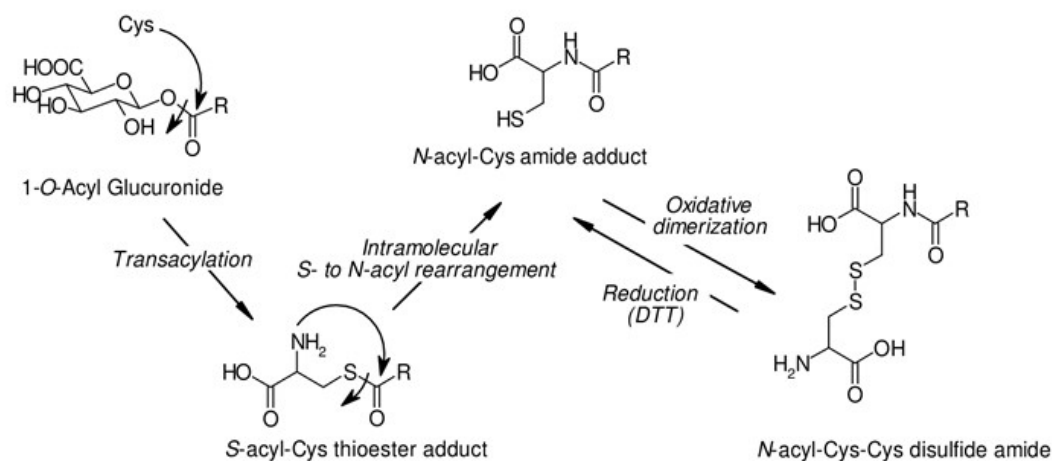


Fig. 15 Proposed reaction pathways for the formation of an N-acyl-Cys amide adduct (R = xenobiotic moiety).

興味深いことに，Grillo らの報告によると，カルボキシ基を有する種々の薬物の S-アシル GSH 抱合体（チオエステル体）は  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GTP) による代謝を受け， $\gamma$ -グルタミル基が外れた結果 N-アシル CG 抱合体（アミド体）を生じることが知られている (Fig. 16) <sup>45),46)</sup>．この反応は生理的条件下 (pH 7.4 緩衝液中)，室温にて速やかに進行する化学的な反応であると考察されている．Clofibric acid (clofibrate の活性本体) では，その N-アシル CG 体（アミド体）はさらに酸化されてジスルフィド体を生成することが知られている．S-アシル GSH 抱合体は  $\gamma$ -GTP により  $\gamma$ -グルタミル基が外れ，フリーになった Cys のアミノ基が反応性の高いチオエステル結合にアタックし，より安定な N-アシル CG 抱合体（アミド体）が生成するものと推察される

(分子内 S- to N-アシル転移). この反応はチオエステル結合の有する高い反応性に基づいているが, 例えば, アシル CoA (S-アシル CoA チオエステル体) は  $\beta$  酸化や解糖系等, 生体内の種々の転移反応の中間体として知られているが, これはチオエステル結合の高い反応性の示す良い例である. <sup>47),48)</sup> このことから, チオエステル結合はオキシエステル結合よりむしろ反応性が高く, より不安定な結合形態であることが理解できる.

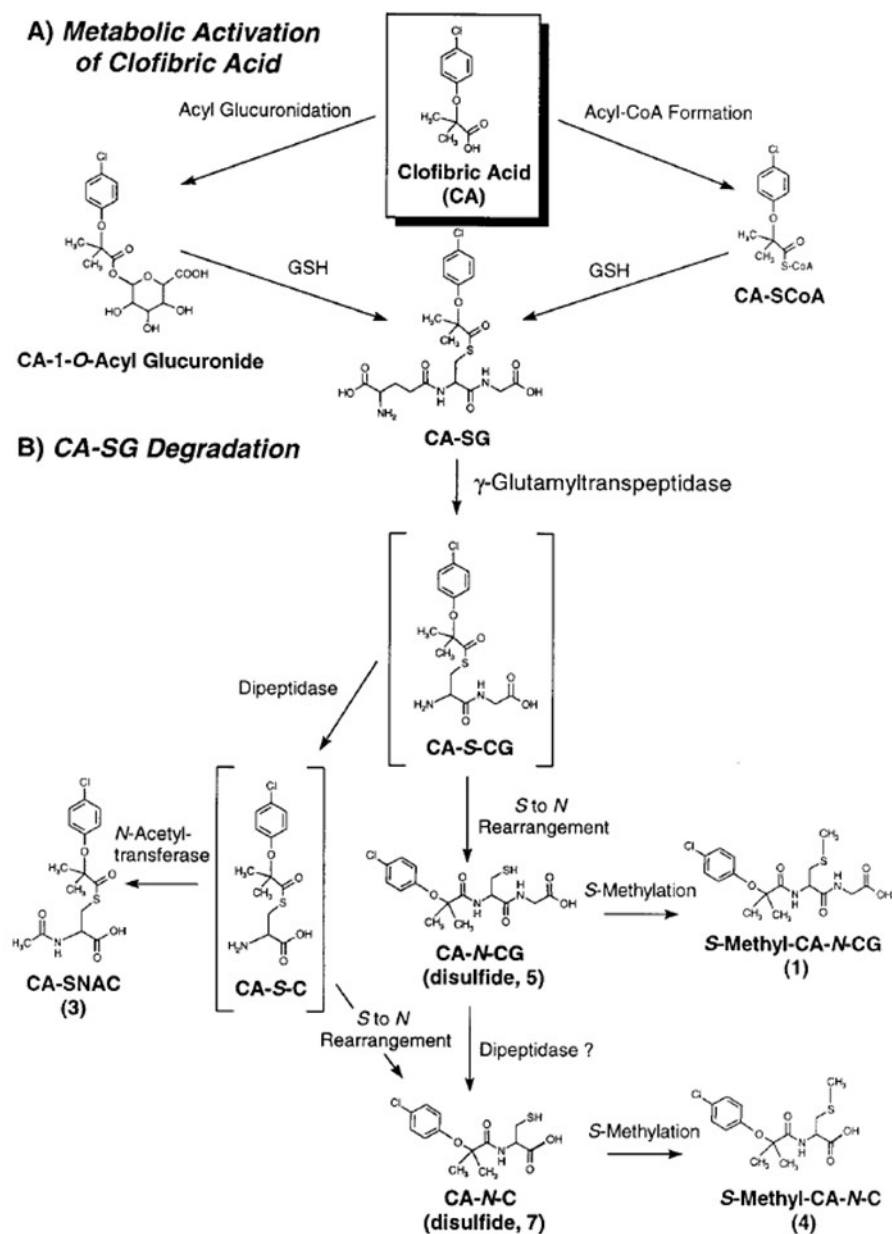


Fig. 16 Formation of N-acyl CG conjugate (amide) from S-acyl GSH conjugate (ester) by  $\gamma$ -GTP. <sup>45)</sup>

前述したように, GSH トラッピングアッセイにおいては, AG から生成した GSH 付加体は不安定なチオエステル結合を有するために, 反応溶液中で容易に加水分解を受け消失すると考えられた. したがって, GSH トラッピングアッセイで AG のトラッピング評価を行うことは困難である. その一方, Cys トラッピングアッセイでは, 同様に不安定なチオエステル結合を有する S-アシル Cys 付加体が生成するものの, その後さらに Cys のフリーのアミノ基により分子内 S- to N-アシル転移が生じ, アミド結合を有する N-アシル Cys 付加体が生成した. 化学的により安定なアミド結合を有する Cys 付加体は, 生理的条件下である反応液中においても分解を受け難く安定的に存在するため, より低感度で汎用性の高い UV 測定においても検出することが可能であったと考えられた (Fig. 17).

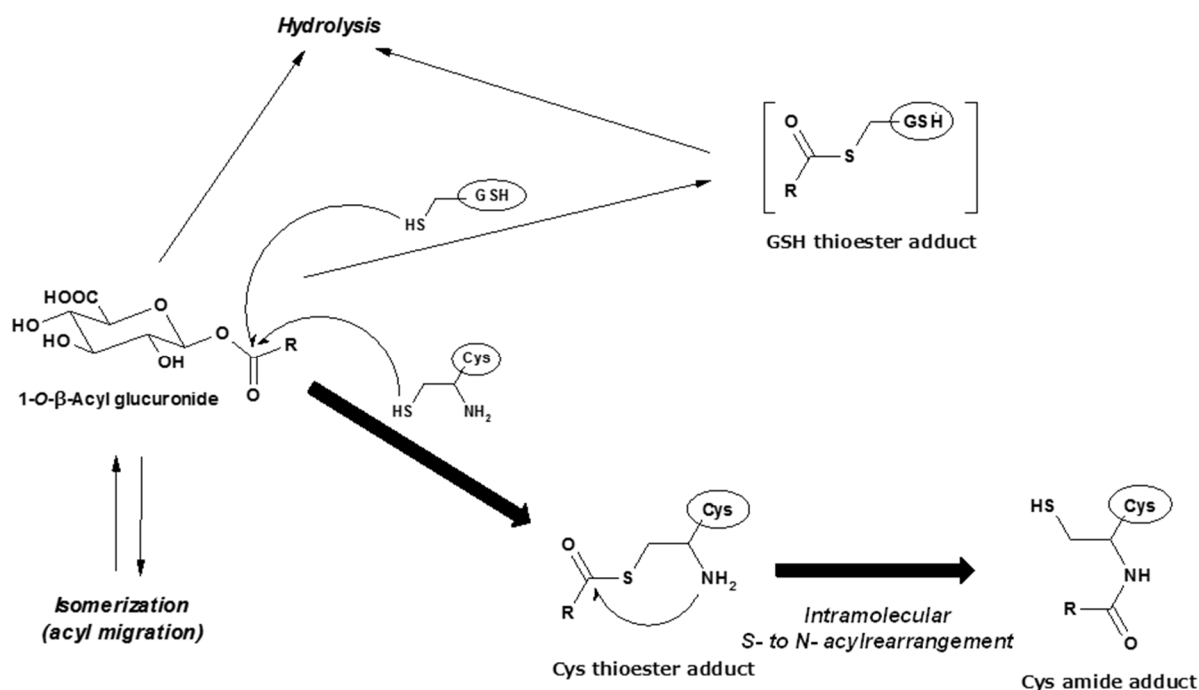


Fig. 17 Postulated reaction pathways for *in vitro* cysteine trapping of AG through S-transacylation followed by S to N-acyl rearrangement (R = xenobiotic moiety).

## 2-4 小括

精密質量測定に基づく MS フラグメント解析や DTT を用いた化学的アプローチにより, トラッピングアッセイにおいて生成した Cys (又は CG) 付加体の構造推定を行った. その結果, 薬物のカルボキシ基と Cys (又は CG) のアミノ基がアミド結合を介して結合していると推定された. Cys 及び CG 付加体の構造の共通点としては,

Cys のチオール基とアミノ基の両方がフリーであることが挙げられる。一方で、アミノ基やチオール基のいずれか単独しか有さない他の Cys 誘導体では付加体の生成は見られなかった。以上の結果を併せて考えると、付加体は下記の 3 段階の反応メカニズムにより生成されると推定された。まず、カルボキシ基を有する薬物が UGT によりグルクロン酸抱合を受け、エステル結合を有する AG に代謝される。次に、AG のエステル結合と Cys のチオール基の間で O- to S-アシル転移が生じ、不安定なチオエステル結合を有する S-アシル Cys 付加体が生成する。最後に、S-アシル Cys 付加体のチオエステル結合と Cys のアミノ基との間で分子内 S- to N-アシル転移が生じ、安定なアミド結合を有する N-アシル Cys 付加体が生成する。カルボキシ基を有する薬物はこの一連のアシル転移反応を経由し、より高い反応性を獲得した結果、アミノ基と共有結合すると考えられた。



### 第3章 Cys 付加体の生成経路とヒト毒性リスクとの関係性

#### 3-1 序論

AG のタンパク質への共有結合メカニズムとしては、2 種類の反応経路が提唱されている。一つ目は、AG がアシル転移によりグルクロン酸部分を失い共有結合する経路 (acylation 経路) であり、二つ目は、AG がグルクロン酸部分を保持したままメイラード反応により共有結合する経路 (glycation 経路) である。<sup>21)-26)</sup> Cys トラッピングアッセイにおいて生成した Cys 付加体は、薬物のカルボキシ基と Cys のアミノ基がアミド結合を介して結合した構造を有していたことから、acylation 経路を介して生成したと考えられる。その一方で、glycation 経路を介した付加体については生成が認められていない。

グルクロン酸抱合を介した代謝的活性化の評価法としてトラッピングアッセイはほとんど実施されていないが、Lys-Phe (KF) peptide あるいは dansyl 化 KF (dKF) peptide を用いた付加体生成の報告例がある (Fig. 18)。<sup>49),50)</sup> この KF peptide を用いた方法では、peptide 付加体の生成量と AG 異性化割合との間に一定の相関が認められることから、AG の反応性評価としての妥当性が確認されている。さらに、dKF peptide を用いた方法では、生じた peptide 付加体を蛍光検出可能であることから定量性がより高められている。また、KF peptide トラッピングにおいては、acylation 経路と glycation 経路の両方の反応が生じ、acylation 付加体と glycation 付加体の 2 種類が生成するが、glycation 付加体の生成量が高い AG の方がより高い毒性リスクを有する傾向にあることが示唆されている。そこで、Cys トラッピングアッセイにおいても、acylation 経路だけでなく glycation 経路も考慮した反応条件を検討することとした。

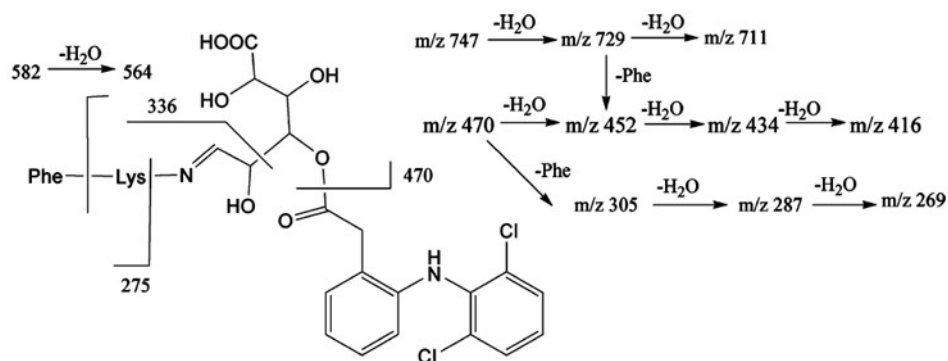


Fig. 18 KF peptide adduct (Schiff base) formation from diclofenac AG and the MS fragmentation pattern of its molecular ion at  $m/z$  747.<sup>49)</sup>

一般的なトラッピングアッセイでは、トラッピング試薬は反応溶液中に予め添加されており、反応開始と同時に生成する不安定な反応性代謝物を逐次トラップし、安定な付加体として検出することを目的としている。これまで検討してきた Cys トラッピングアッセイにおいても、トラッピング試薬である Cys は同様に代謝反応の前に添加され、インキュベーション中に生成された AG をトラップすることにより安定な acylation 付加体を生成する。一方、acylation 付加体と glycation 付加体の両方を生成すると報告されている KF peptide トラッピング法においては、KF peptide は反応停止後に添加される。すなわち、KF peptide トラッピング法においては、有機溶媒である acetonitrile の添加により反応停止した後、KF peptide を添加し 37°C で 3 時間インキュベーションすることにより AG をトラップするものである。KF peptide を反応停止後に添加する理由は、下記の 2 つの理由のためであろうと推察される。一つ目は、KF peptide を反応溶液に予め添加すると、肝ミクロソーム中に含まれる peptidase によって KF peptide が分解してしまう可能性がある。二つ目としては、glycation 経路は反応速度の遅いメイラード反応（通常、高温で長時間のインキュベーションが必要とされる）であることから、トラッピングアッセイのような温和で短時間の反応条件では付加体がほとんど生成しない可能性もある。<sup>51),52)</sup> したがって、KF peptide を用いた方法は生理的条件における反応性代謝物のトラッピングというよりむしろ、生理的条件から離れた反応条件における誘導体化反応と見なしてもよいかもしれない。いずれにしても、KF peptide トラッピング法により glycation 付加体が生成していることから、Cys トラッピング法においてもトラッピング試薬 Cys の代謝反応停止後添加法を検討し、生成する付加体の種類（acylation 付加体及び glycation 付加体）について検証を行った。

## 3-2 実験

### 3-2-1 試薬

Diclofenac sodium, ketoprofen, ibuprofen, zomepirac, tolmetin, fenoprofen calcium hydrate, probenecid, gemfibrozil, UDPGA, Cys 及び alamethicin は Sigma-Aldrich から購入した。Bromfenac は AvaChem Scientific (San Antonio, TX, USA) から購入した。Ibuprofen は Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada) から購入した。Indomethacin 及び repaglinide は和光純薬工業 (Osaka, Japan) から購入した。Furosemide はナカライテスク (Kyoto, Japan) から購入した。アセトニトリル (HPLC 用) 及び蒸留水 (HPLC 用) は関東化学から購入した。プールヒト肝ミクロソームは XenoTech から購入した。その他の試薬は、入手可能な最も高い品質の試薬を購入し使用した。

### 3-2-2 試薬の調製

Diclofenac sodium, ketoprofen, ibuprofen, zomepirac, bromfenac, ibufenac, tolmetin, indomethacin, fenoprofen calcium hydrate, probenecid, furosemide, repaglinide 及び gemfibrozil のそれぞれ 3.2, 2.5, 2.1, 3.1, 3.3, 1.9, 3.2, 3.6, 5.2, 2.9, 3.3, 4.5 及び 2.5 mg をアセトニトリル/蒸留水 (1,1, v/v) 混液 1 mL に溶解して, 10 mM diclofenac, ketoprofen, ibuprofen, zomepirac, bromfenac, ibufenac, tolmetin, indomethacin, fenoprofen, probenecid, furosemide, repaglinide 及び gemfibrozil 溶液を調製した. UDPGA 31.6 mg を蒸留水 1 mL に溶解して, 50 mM UDPGA 溶液を調製した (用時調製). Cys 6.1 mg を蒸留水 1 mL に溶解して, 50 mM Cys 溶液を調製した (用時調製). Alamethicin 5.0 mg をメタノール 200  $\mu$ L に溶解した後, 蒸留水にて 100 倍希釈し, 250  $\mu$ g/mL alamethicin 溶液を調製した.  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.51 mg を蒸留水 50 mL に溶解して, 50 mM  $\text{MgCl}_2$  を調製した.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  及び  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$  のそれぞれ 3.48 及び 2.72 g を蒸留水 100 mL に溶解して 200 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  及び  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$  溶液を調製した. 200 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  溶液及び 200 mM  $\text{KH}_2\text{HPO}_4$  溶液を混合して, pH を 7.4 に調整し, 200 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を調製した. 酢酸アンモニウム 0.77 g を蒸留水 1 L に溶解して 10 mM 酢酸アンモニウム溶液を調製した. 10 mM 酢酸アンモニウム溶液に酢酸を添加して, pH を 5.0 に調整し, 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0) を調製した.

### 3-2-3 Cys トラッピングアッセイ (代謝反応前 Cys 添加法)

反応溶液 (計 100  $\mu$ L/tube) を下記の組成にて調製した: 400  $\mu$ M 評価化合物 (diclofenac, ketoprofen, ibuprofen, zomepirac, bromfenac, ibufenac, tolmetin, indomethacin, fenoprofen, probenecid, furosemide, repaglinide 又は gemfibrozil), 1.0 mg protein/mL ヒト肝ミクロソーム, 5 mM UDPGA, 5 mM Cys, 25  $\mu$ g/mL alamethicin, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  及び 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4). 反応溶液を 37°C で 60 分間インキュベーション後, アセトニトリル 100  $\mu$ L 及び酢酸 10  $\mu$ L を添加し反応停止した. 反応停止後の混液を遠心分離 (13,800 g, 4°C, 5 分間) し, その上清を UHPLC-QToFMS により測定した.

### 3-2-4 Cys トラッピングアッセイ (代謝反応後 Cys 添加法)

反応溶液 (計 100  $\mu$ L/tube) を下記の組成にて調製した: 400  $\mu$ M 評価化合物 (diclofenac, ketoprofen, ibuprofen, zomepirac, bromfenac, ibufenac, tolmetin, indomethacin, fenoprofen, probenecid, furosemide, repaglinide 又は gemfibrozil), 1.0 mg protein/mL ヒト肝ミクロソーム, 5 mM UDPGA, 25  $\mu$ g/mL alamethicin, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  及び 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4). 反応溶液を 37°C で 60 分間インキュベーション後, アセトニトリル 100  $\mu$ L を添加し反応停止し. 反応停止後の混液を遠心分離 (13,800 g, 4°C, 5 min) した.

遠心分離後の上清の全量に 50 mM Cys 溶液 10  $\mu$ L を添加し、37°C で 3 時間インキュベーションした。インキュベーション後の混液を UHPLC-QToFMS により測定した。

### 3-2-5 UHPLC-QToFMS 測定

LC 分析は、UHPLC システム Acquity UPLC を使用し、以下の分析条件にて実施した。

- Column : Acquity UPLC BEH C18 (1.7  $\mu$ m, 2.1  $\times$  50 mm)
- Mobile phase A : 10 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.0)
- Mobile phase B : アセトニトリル
- Gradient :

Time (min)	0	3	13	16	16.1	20
%B	15	15	60	60	15	15

- Flow rate : 0.2 mL/min
- Column temperature : 40°C
- Temperature in an autoinjector : 4°C
- Injection volume : 20  $\mu$ L

MS 分析は、QToF 型質量分析計 Xevo G2 QToF を使用し、以下の分析条件にて精密質量を測定した。MS/MS 測定は、MS<sup>E</sup> scan mode により行った。

- Ionization : Electro-spray ionization (ESI)
- Capillary voltage : 3.0 kV
- Sampling cone voltage : 20 V
- Extraction cone voltage : 3.0 V
- Source temperature : 120°C
- Desolvation temperature : 350°C
- Cone gas : 50 L/h
- Desolvation gas : 800 L/h
- MS<sup>E</sup> scan :  $m/z$  200 to 800 in positive and negative ion mode
- Collision energy : 6 eV (low) and 15–35 eV (high)
- MS resolution : more than 20,000 (FWHM) in resolution mode
- Accurate mass calibration : Sodium formate
- Accurate mass correction using a lockspray device : Leu-enkephalin

### 3-3 結果及び考察

#### 3-3-1 Cys トラッピングアッセイにおける代謝反応後 Cys 添加法の検討

UDPGA 存在下，評価化合物をヒト肝ミクロソーム中でインキュベート（37°C，60 分）後，アセトニトリルで反応停止した．この反応停止液に Cys を添加し，インキュベート（37°C，3 時間）した後に遠心分離した．この遠心後上清を UHPLC-QToFMS にて分析した．また，代謝反応前 Cys 添加法についてもこれまで同様実施し，代謝反応後 Cys 添加法の結果と比較した．評価化合物としては，その化学構造に基づいて 13 薬物を選択した（Table 3 及び Fig. 19）．一般的に，カルボキシ基を有する薬物の化学構造と，その AG の反応性や臨床における毒性リスクは密接に関連していると考えられていることから，酢酸（AA）タイプ，プロピオン酸（PA）タイプ，安息香酸（BA）タイプ及びその他（Other）の 4 タイプに分類した．<sup>19),29),49),50),53)</sup>

Table 3 Carboxylic acid-containing test drugs and their toxicological categories

Structure	Drug	Maximum daily dose (mg/day)	IDT	IDT Risk
AA	1 Zomepirac	600	Anaphylaxis, DILI	WDN
	2 Bromfenac	50	DILI	WDN
	3 Ibufenac	4000	DILI	WDN
	4 Tolmetin	1800	Anaphylaxis, DILI, skin reaction	WNG
	5 Diclofenac	150	Anaphylaxis, DILI, skin reaction	WNG
	6 Indomethacin	200	Anaphylaxis, DILI, skin reaction	WNG
PA	7 Ketoprofen	800	Anaphylaxis, skin reaction	WNG
	8 Fenoprofen	3200	Anaphylaxis, skin reaction	WNG
	9 Ibuprofen	3200	Anaphylaxis	WNG
BA	10 Probenecid	1000	Anaphylaxis	SAFE
	11 Furosemide	80		SAFE
	12 Repaglinide	16		SAFE
Other	13 Gemfibrozil	1200		SAFE

AA: acetic acid derivative, PA: propionic acid derivative, BA: benzoic acid derivative, IDT: idiosyncratic toxicity, DILI: drug-induced liver injury, WDN: withdrawn, WNG: warning

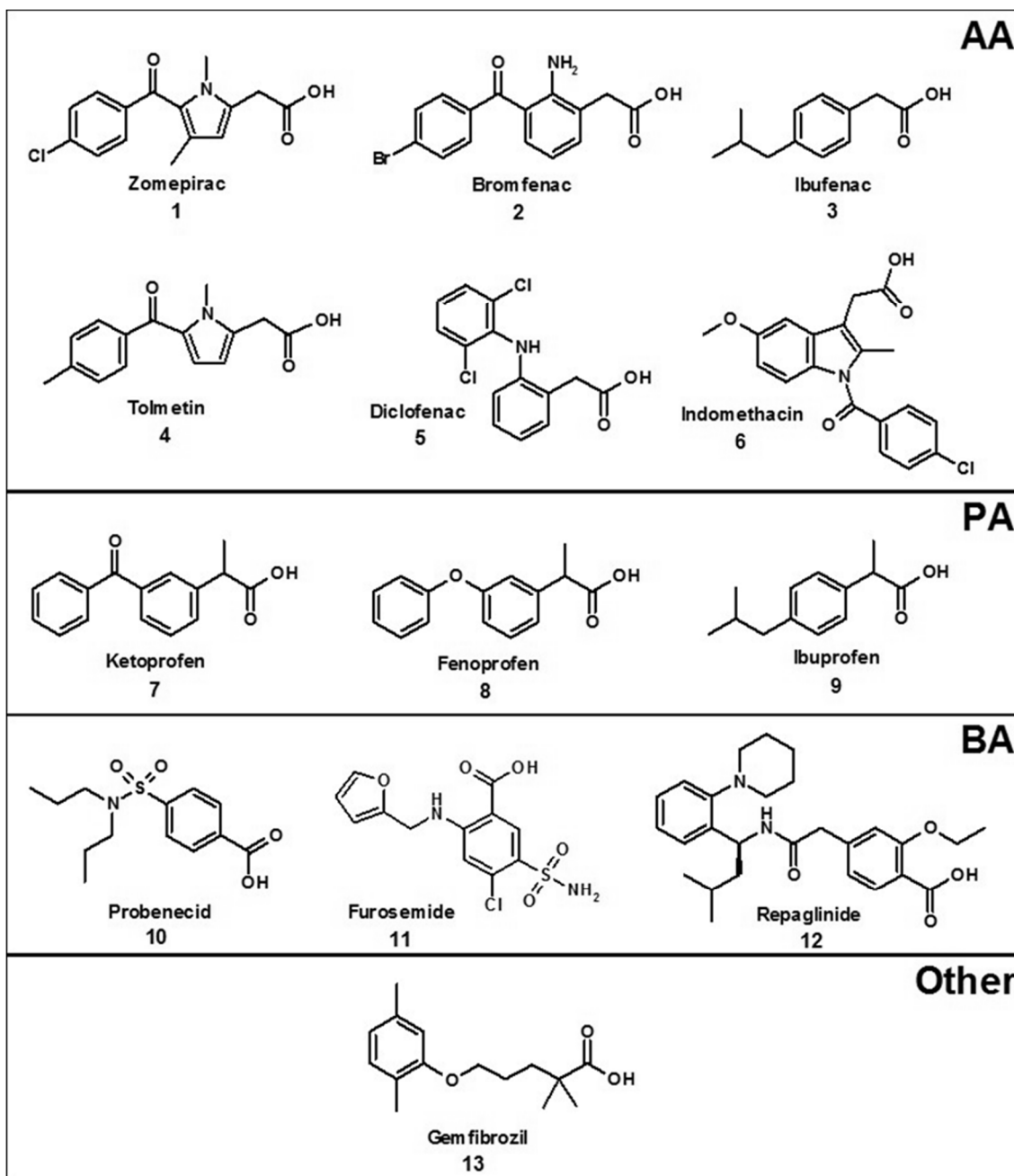


Fig. 19 Carboxylic acid-containing test drugs. AA: acetic acid derivative, PA: propionic acid derivative, BA: benzoic acid derivative.

Diclofenac 評価時の UHPLC-QToFMS 分析の結果を Fig. 20 に示す。代謝反応前 Cys 添加法では, diclofenac の acylation Cys 付加体に相当するイオンが検出されたが, glycation Cys 付加体に相当するイオンは検出されなかった (Fig. 20 (A)). 一方, 代謝反応後 Cys 添加法においては, diclofenac の acylation Cys 付加体及び glycation Cys 付

加体に相当するイオンの両方が検出された (Fig. 20 (B)). Diclofenac の acylation Cys 付加体は  $m/z$  399.0330 ( $[M+H]^+$ ) にて検出され, diclofenac ( $m/z$  296.0245,  $[M+H]^+$ ) に比して+103.0085 Da の mass shift (Cys 部分) を示し, MS<sup>E</sup> 分析により, diclofenac 部分に特徴的なマスフラグメンテーションパターン ( $m/z$  278.0139, 250.0190 及び 215.0497) を示した (Fig. 20 (C)). Glycation 付加体は  $m/z$  575.0662 ( $[M+H]^+$ ) のシングルピークとして検出され, diclofenac に比して+279.0417 Da の mass shift (cysteinyl glucuronic acid 部分) を示した (Fig. 20 (D)). また, MS<sup>E</sup> 分析により, diclofenac 部分に特徴的なマスフラグメンテーションパターン ( $m/z$  278.0150, 250.0187 及び 215.0495) だけでなく, cysteinyl glucuronic acid 部分に特徴的なマスフラグメンテーションパターン ( $m/z$  298.0586, 280.0499 及び 262.0374) を示した.

評価した 13 化合物の Cys 付加体や AG の測定精密質量の一覧を Table 4 に示す. いずれの化合物も diclofenac と同様, 代謝反応前 Cys 添加法においては acylation Cys 付加体に相当するイオンのみが検出された. また, 代謝反応後 Cys 添加法においても同様に, acylation Cys 付加体及び glycation Cys 付加体に相当するイオンの両方が検出された.

以上の結果より, Cys トラッピングアッセイにおいて, 代謝反応後 Cys 添加法により acylation Cys 付加体及び glycation Cys 付加体の両方が生成することを確認することができた.

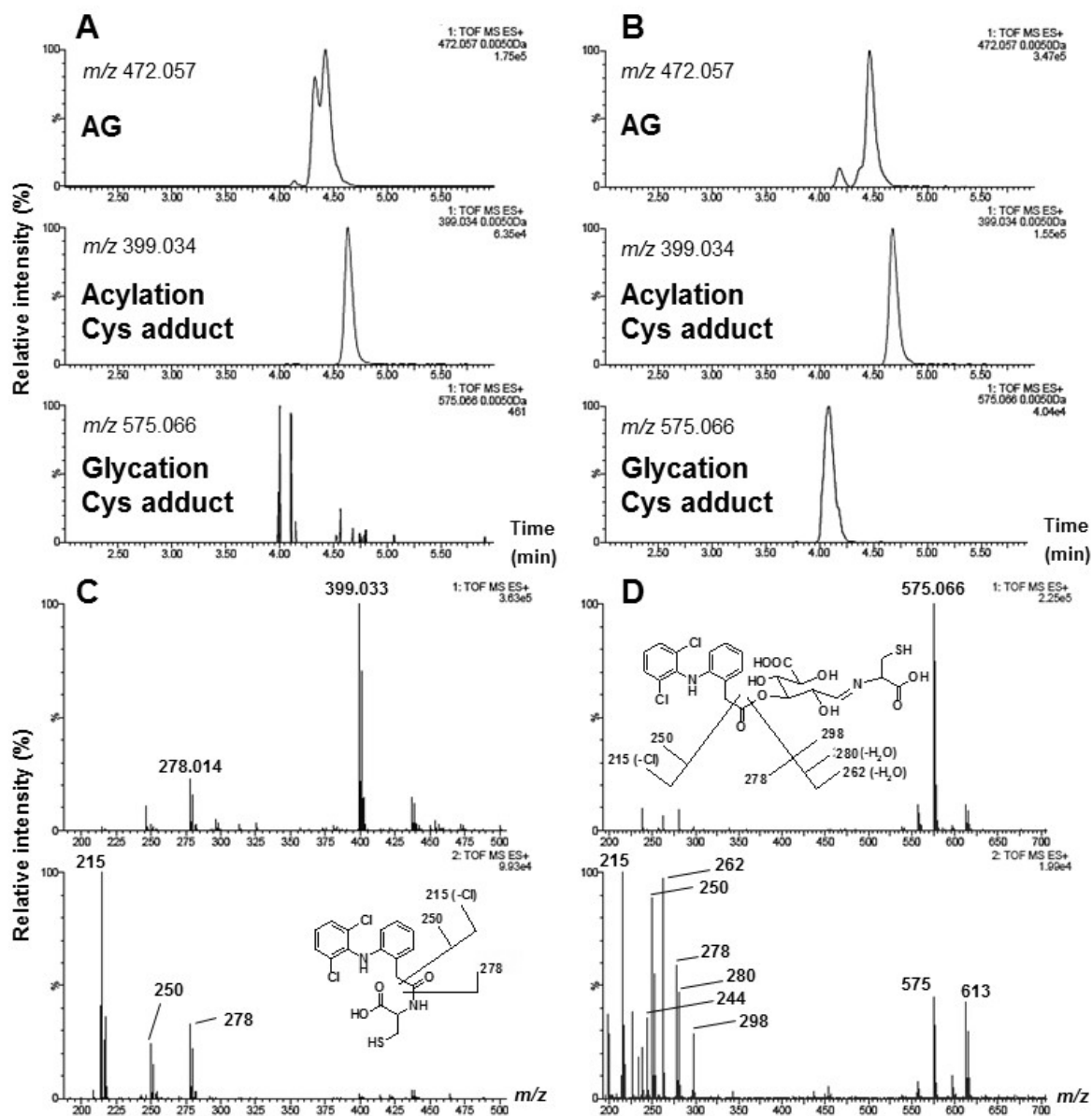


Fig. 20 UHPLC-QToFMS analysis data of AGs and Cys adducts of diclofenac. Extracted ion chromatograms (in positive ion full scan mode) of AGs, acylation Cys adduct, and glycation Cys adduct of diclofenac in a Cys pre-addition (A) or Cys post-addition (B) procedure. Accurate MS and MS<sup>E</sup> spectra of acylation Cys adduct (C) and glycation Cys adduct (D) of diclofenac.



Table 4 Accurate MS analysis data of all the test drugs and their Cys adducts

Compounds	Molecular Formula	Ion	m/z			Mass Difference (mDa)	
			Theoretical	Found		Pre-Addition	Post-Addition
				Pre-Addition	Post-Addition		
Zomepirac	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> ClNO <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	292.0740	292.0737	292.0742	-0.3	0.2
Glucuronide	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>9</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	468.1061	468.1057	468.1059	-0.4	-0.2
Acylation Cys adduct	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	395.0832	395.0826	395.0828	-0.6	-0.4
Glycation Cys adduct	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	571.1153	N.D.	571.1160	-	0.7
Bromfenac	C <sub>19</sub> H <sub>12</sub> BrNO <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	334.0079	334.0078	334.0077	-0.1	-0.2
Glucuronide	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrNO <sub>9</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	510.0400	510.0408	510.0399	0.8	-0.1
Acylation Cys adduct	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	437.0171	437.0177	437.0169	0.6	-0.2
Glycation Cys adduct	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	613.0491	N.D.	N.D.	-	-
Ibuprofen	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	[M-H]	191.1072	191.1077	191.1073	0.5	0.1
Glucuronide	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	[M-H]	367.1393	367.1397	367.1395	0.4	0.2
Acylation Cys adduct	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub> S	[M-H]	294.1164	294.1168	294.1167	0.4	0.3
Glycation Cys adduct	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>9</sub> S	[M-H]	470.1485	N.D.	470.1478	-	-0.7
Tolmetin	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	258.1130	258.1131	258.1136	0.1	0.6
Glucuronide	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>9</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	434.1451	434.1449	434.1450	-0.2	-0.1
Acylation Cys adduct	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	361.1222	361.1222	361.1225	0.0	0.3
Glycation Cys adduct	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	537.1543	N.D.	537.1545	-	0.2
Diclofenac	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	296.0245	296.0245	296.0240	0.0	-0.5
Glucuronide	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	472.0566	472.0567	472.0560	0.1	-0.6
Acylation Cys adduct	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	399.0337	399.0330	399.0334	-0.7	-0.3
Glycation Cys adduct	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	575.0658	N.D.	575.0662	-	0.4
Ketoprofen	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	255.1021	255.1023	255.1023	0.2	0.2
Glucuronide	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	448.1608	448.1609	448.1601	0.1	-0.7
Acylation Cys adduct	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	358.1113	358.1115	358.1114	0.2	0.1
Glycation Cys adduct	C <sub>28</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>10</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	534.1434	N.D.	534.1429	-	-0.5
Fenoprofen	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	[M-H]	241.0865	241.0865	241.0862	0.0	-0.3
Glucuronide	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	[M-H]	417.1186	417.1184	417.1183	-0.2	-0.3
Acylation Cys adduct	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub> S	[M-H]	344.0956	344.0954	344.0955	-0.2	-0.1
Glycation Cys adduct	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>10</sub> S	[M-H]	520.1277	N.D.	520.1279	-	0.2
Ibuprofen	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	[M-H]	205.1228	205.1229	205.1228	0.1	0.0
Glucuronide	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	[M-H]	381.1549	381.1547	381.1551	-0.2	0.2
Acylation Cys adduct	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub> S	[M-H]	308.1320	308.1317	308.1317	-0.3	-0.3
Glycation Cys adduct	C <sub>22</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>9</sub> S	[M-H]	484.1641	N.D.	484.1654	-	1.3
Indomethacin	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> ClNO <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	358.0846	358.0845	358.0845	-0.1	-0.1
Glucuronide	C <sub>26</sub> H <sub>24</sub> ClNO <sub>10</sub>	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	551.1432	551.1442	551.1432	1.0	0.0
Acylation Cys adduct	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	461.0938	461.0941	461.0934	0.3	-0.4
Glycation Cys adduct	C <sub>28</sub> H <sub>29</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>11</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	637.1259	N.D.	637.1257	-	-0.2
Probenecid	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	286.1113	286.1113	286.1110	0.0	-0.3
Glucuronide	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>10</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	462.1434	462.1436	462.1425	0.2	-0.9
Acylation Cys adduct	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	389.1205	389.1200	389.1196	-0.5	-0.9
Glycation Cys adduct	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>11</sub> S <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	565.1526	N.D.	565.1526	-	0.0
Furosemide	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	[M-H]	328.9999	329.0001	328.9997	0.2	-0.2
Glucuronide	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>11</sub> S	[M-H]	505.0320	505.0323	505.0318	0.3	-0.2
Acylation Cys adduct	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	[M-H]	432.0091	N.D.	432.0081	-	-1.0
Glycation Cys adduct	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>12</sub> S <sub>2</sub>	[M-H]	608.0411	N.D.	N.D.	-	-
Repaglinide	C <sub>27</sub> H <sub>39</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	453.2753	453.2761	453.2756	0.8	0.3
Glucuronide	C <sub>33</sub> H <sub>44</sub> N <sub>2</sub> O <sub>10</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	629.3074	629.3076	629.3071	0.2	-0.3
Acylation Cys adduct	C <sub>30</sub> H <sub>41</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	556.2845	556.2841	556.2845	-0.4	0.0
Glycation Cys adduct	C <sub>36</sub> H <sub>49</sub> N <sub>3</sub> O <sub>11</sub> S	[M+H] <sup>+</sup>	732.3166	N.D.	732.3157	-	-0.9
Gemfibrozil	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	[M-H]	249.1491	249.1491	249.149	0.0	-0.1
Glucuronide	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>9</sub>	[M-H]	425.1812	425.1812	425.1805	0.0	-0.7
Acylation Cys adduct	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>4</sub> S	[M-H]	352.1583	N.D.	352.1588	-	0.5
Glycation Cys adduct	C <sub>24</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>10</sub> S	[M-H]	528.1904	N.D.	N.D.	-	-

N.D.: Not Detected

### 3-3-2 代謝反応前/後 Cys 添加法における acylation/glycation 付加体生成とヒト毒性リスクとの関係性の検証

代謝反応前 Cys 添加法における acylation 付加体の MS ピーク面積値を Fig. 21 (A) に示す. 撤退薬 (WDN) あるいは警告薬 (WNG) に分類される zomepirac, bromfenac, ibufenac, tolmetin, diclofenac, indomethacin, ketoprofen, fenoprofen 及び ibuprofen は, acylation Cys 付加体の MS ピーク面積値が高く, 安全薬 (SAFE) に分類される probenecid, furosemide, repaglinide 及び gemfibrozil は acylation Cys 付加体の MS ピーク面積値が低かった. これらの結果から, Cys 付加体の MS ピーク面積値は薬物の毒性リスクを反映する可能性が示唆された.

また, Cys 付加体の生成量は AG の有する反応性だけでなく AG の生成量にも依存すると考えられる. そこで, AG 生成量の影響を排除し, AG そのものの反応性を評価することを目的として, Cys 付加体の MS ピーク面積値を AG の MS ピーク面積値で除することにより補正を行った. 代謝反応前 Cys 添加法における acylation Cys 付加体の MS ピーク面積値を補正した結果を Fig. 21 (B) に示す. なお, AG の MS ピーク面積値は, AG の異性体も含めた合計の AG の MS ピーク面積値として計算に用いた. 補正の結果, WDN 薬 bromfenac が高値を示したことから, bromfenac については AG そのものの反応性が高いことが明らかとなった.

続いて, 代謝反応前 Cys 添加法あるいは代謝反応後 Cys 添加法における acylation Cys 付加体あるいは glycation Cys 付加体の MS ピーク面積 (AG の MS ピーク面積による補正あり) を Fig. 21 (C) に示す. 代謝反応後 Cys 添加法における glycation Cys 付加体の生成量は, zomepirac, tolmetin, diclofenac 等で高く, KF peptide トラッピング法で報告されているように, IDT リスクをある程度反映していることが示された. しかしながら, WDN に分類される bromfenac や ibufenac においては, 付加体生成がほとんど見られず, 一部の化合物については考察が難しい結果となった. また, 代謝反応後 Cys 添加法における acylation Cys 付加体の MS ピーク面積は, 全ての WDN/WNG 薬で高い値を示したことから, IDT リスクを良く反映していると考えられた. しかしながら, SAFE 薬においても付加体の生成が見られたため, 一部の化合物では考察が難しい結果となった. 一方, 代謝反応前 Cys 添加法における acylation 付加体の生成量は, WDN/WNG 薬で高く, SAFE 薬では付加体がほとんど生じなかったことから, SAFE 薬と non-SAFE 薬を切り分けて評価できる可能性が示された. ただし, 化合物によって MS 分析の検出感度が異なると考えられることから, MS ピーク面積値が付加体の生成量を正確に反映しているとは限らない. したがって, 例えば, 放射性同位体標識した Cys を用いるなどして定量性を高めるようなさらなる工夫が必要と考えられた.

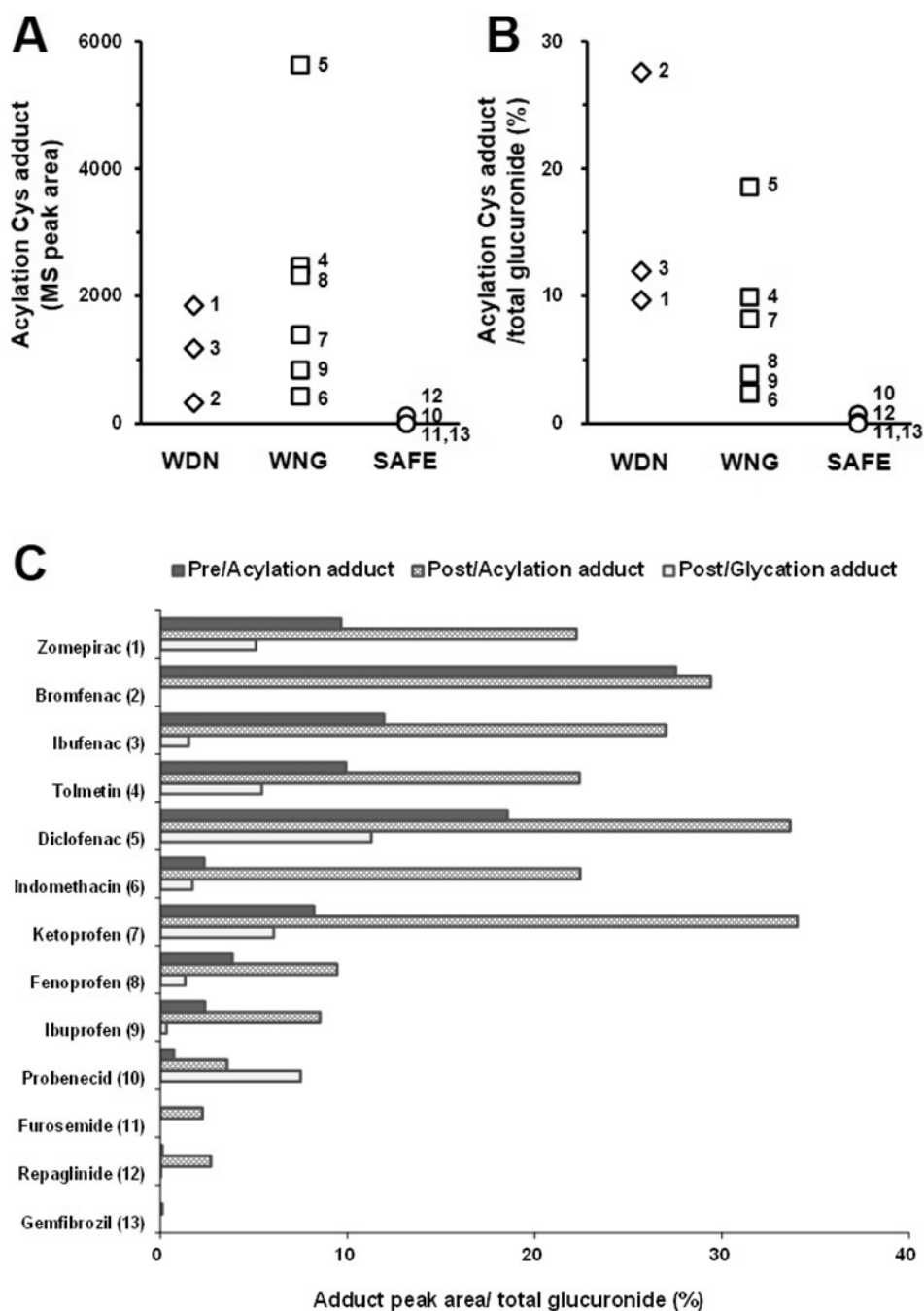


Fig. 21 Production of Cys adducts of 13 carboxylic acid-containing test drugs: (A) MS peak area of acylation Cys adduct in the Cys pre-addition procedure; (B) MS peak area ratio of acylation Cys adduct to total AGs formed, including the AG isomers in the Cys pre-addition procedure; (C) MS peak area ratio of acylation/glycation Cys adduct to total AGs formed, including the AG isomers in the Cys pre-/post-addition procedure.

### 3-3-3 Cys トラッピング法における acylation/glycation 経路

Cys トラッピング法における Cys 付加体生成経路と acylation/glycation 経路との関係性を Fig. 22 に示す。Acylation 経路では、まず、AG のエステル結合のカルボニル炭素が、タンパク質などのアミノ基 (Cys トラッピング法においては、Cys のチオール基) により求核的なアタックを受けることから始まる。Glycation 経路においては、Schiff 塩基を生じるためにはアシル基の結合している glucuronic acid 部分の C-1 位ヒドロキシ基がフリーになる必要があるため、C-1 位ヒドロキシ基から C-2 位ヒドロキシ基へのアシル転移がその一連の反応の 1st step となる。したがって、acylation 経路だけでなく glycation 経路においても AG のエステル結合のカルボニル炭素が求核的なアタックを受ける反応が、共通の 1st step と考えられる。代謝反応前 Cys 添加法による Cys トラッピング法では、Cys のチオール基により速やかにアシル転移が生じ、生成したチオエステル体は不安定であるものの、加水分解を受ける前に速やかに分子内 S- to N-アシル転移を生じると考えられ、その結果、acylation Cys 付加体が生成される。その一方で、glycation Cys 付加体の生成は見られない。したがって、Cys トラッピング法においては、AG の分子内アシル転移とこれに続く glycation 経路よりも、Cys のチオール基が AG エステル結合のカルボニル炭素をアタックする反応が十分に速いと考えられた。すなわち、Cys トラッピング法においても acylation 経路と glycation 経路の両経路が進行するものの、Cys のチオール基を介した acylation 経路がドミナントな反応経路であると考えられた。

前述した KF peptide トラッピング法においては、acylation 経路と glycation 経路の両方の反応が生じ、acylation 付加体と glycation 付加体の 2 種類が生成するが、glycation 付加体の生成量が高い AG の方がより高い毒性リスクを有する傾向にあることが示唆されている。Cys トラッピング法においては、通常の acylation 経路と glycation 経路の反応も含めたカルボニル炭素への求核反応の中で、Cys チオール基を介した acylation 経路の反応がドミナントであり、カルボニル炭素への種々の求核反応を代表する反応経路であると考えられた。したがって、Cys トラッピング法においては 2 種類の反応経路を比較することなく、1 種類の反応経路に基づく 1 種類の付加体を評価することにより、簡便に AG の反応性を評価することができると考えられた。

また、KF peptide トラッピング法においては、反応停止した後のアセトニトリルを含む反応停止液中に KF peptide を添加し、37°C で 3 時間インキュベーションを行う必要がある。したがって、生理的条件下において実施されるトラッピングというよりはむしろ、生理的条件から離れた状態での誘導体化反応と見なされる。ヒトにおける毒性発現という観点では、生体内にて反応性代謝物がタンパク質等の高分子へ共有結合

することが重要なステップの一つと考えられるため、生理的条件により近い実験条件下で反応性評価を行う方がより適切と考えられる。したがって、生理的条件により近い反応溶液中にて、生成される反応性代謝物を逐次トラップすることができる Cys トラッピング法は、AG の反応性やヒト生体内における毒性発現の観点においてより適切な評価法であると考えられる。

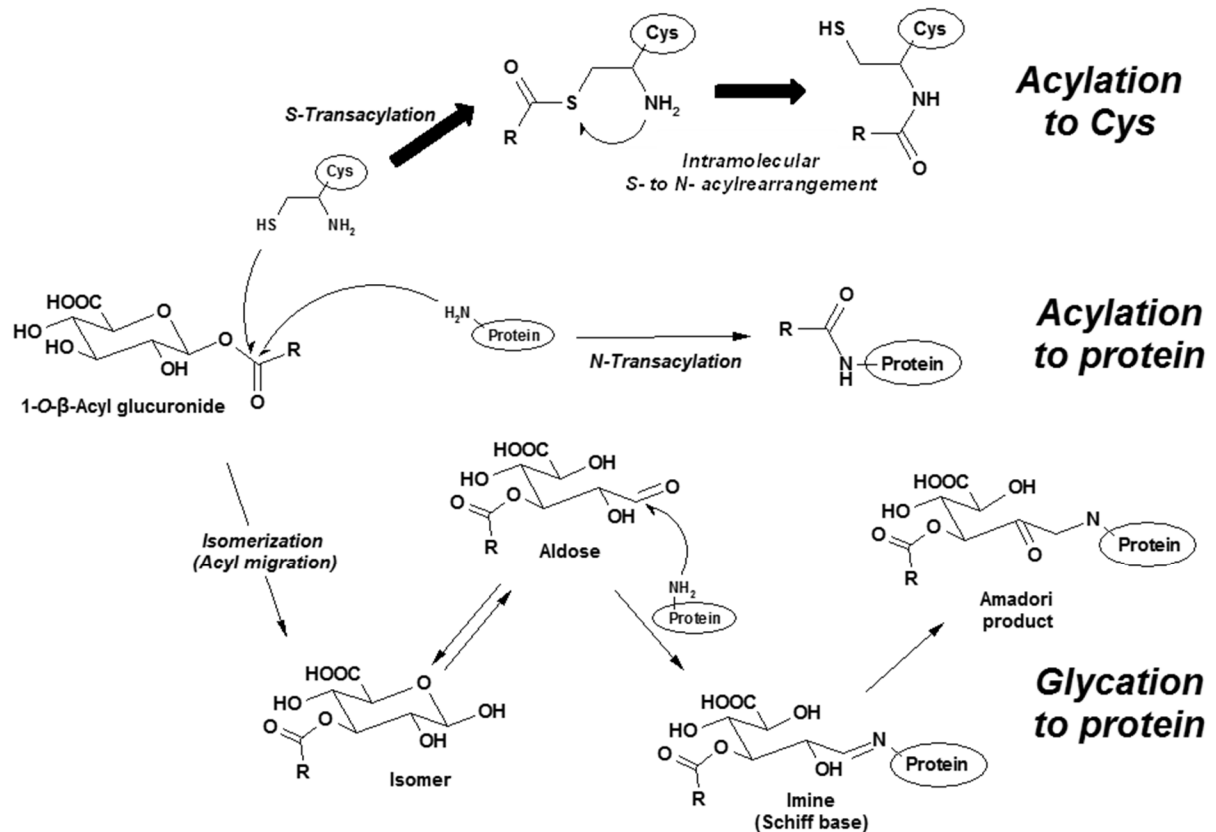


Fig. 22 Acylation and glycation pathways in the Cys trapping assay (R = xenobiotic moiety).

### 3-4 小括

AG のタンパク質への共有結合メカニズムとしては acylation 経路及び glycation 経路の 2 種類の反応経路が提唱されている。Cys トラッピング法においては、acylation 経路に基づいて生成する acylation Cys 付加体のみが検出された。一方、KF peptide をトラッピング試薬として用いる既報においては、代謝反応後 KF peptide 添加法により acylation Cys 付加体及び glycation Cys 付加体の両付加体が生成することが報告され、毒性リスクの観点においては glycation Cys 付加体の方がより重要である可能性が示唆されている。そこで、これまで代謝反応前 Cys 添加法により評価してきた Cys トラ

ッピング法においても、代謝反応後 Cys 添加法により両付加体を生成する反応条件を検討し、生成する付加体の種類や毒性リスクとの関係性を検証した。化学構造分類と IDT リスク分類の観点から、13 薬物を評価化合物として選定し、代謝反応後 Cys 添加法により Cys トラッピングアッセイを行った。精密質量分析の結果、いずれの化合物においても、代謝反応前 Cys 添加法では acylation Cys 付加体のみが検出されたが、代謝反応後 Cys 添加法においては両付加体が検出された。したがって、Cys トラッピング法においても、既報通り、代謝反応後 Cys 添加法により両経路を評価できることが示された。

続いて、付加体生成量と IDT リスクの関係を検証した。まず、代謝反応前 Cys 添加法により 13 薬物の acylation 付加体の MS ピーク面積値を比較したところ、IDT リスクが高い薬物は付加体の MS ピーク面積値も高い傾向が認められた。次に、代謝反応前 Cys 添加法における acylation 付加体の MS ピーク面積値を AG の MS ピーク面積値で補正した結果、IDT リスクをより反映する傾向を示した。続いて、代謝反応前又は代謝反応後 Cys 添加法における acylation 付加体又は glycation 付加体の MS ピーク面積値（AG の MS ピーク面積値による補正あり）を比較したところ、代謝反応前 Cys 添加法における acylation Cys 付加体が最もよく IDT リスクを反映することが明らかとなった。一般的に、生体アミンへの共有結合は acylation 経路及び glycation 経路の 2 経路が存在するが、両者共に共通する 1st step の反応は、AG エステル結合への求核的なアタックである。これに対して、代謝反応前 Cys 添加法による Cys トラッピング法では、AG エステル結合への Cys チオール基のアタックが最も優位な反応経路であり、両経路を包含するような主たる反応経路であると考えられた。したがって、代謝反応前 Cys 添加法における acylation Cys 付加体の生成反応は、AG の反応性の指標としてシンプルかつ高感度であり、有用性が高いと考えられる。

本章では付加体生成量を MS 分析により評価したが、化合物間で MS 感度が異なる可能性があることから、定量的に精確とは限らない。したがって、精度の高い毒性予測を行うためには、付加体生成量評価における定量性を高めるさらなる工夫が必要と考えられた。定量的な Cys トラッピングアッセイ評価系の構築については、次章にて述べる。

## 第4章 $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ を用いた *in vitro* トラッピングアッセイによる付加体生成量の定量化とヒト毒性リスク評価

### 4-1 序論

前章において、Cys トラッピングアッセイ（代謝反応前 Cys 添加法）における acylation Cys 付加体の生成量が AG の反応性やヒト毒性リスクを評価するための有用な指標となりうることが示された。しかしながら、Cys 付加体の生成量は MS 測定による MS ピーク面積値を用いて評価したものの、化合物間で MS 感度が異なる可能性が考えられることから、付加体生成量を精確に評価しているとは限らない。したがって、精度の高い反応性評価を行うためには、付加体生成量評価の定量性をより高める必要がある。

本章では、放射性同位体  $^{35}\text{S}$  で標識した Cys ( $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ ) をトラッピング試薬として用いて *in vitro* トラッピングアッセイを行い、 $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$  に基づく放射能を測定することにより、付加体生成量を定量的に評価することを目的とした。さらに、 $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$  付加体生成量とヒト毒性リスクとの関係性について考察を行った。

### 4-2 実験

#### 4-2-1 試薬

Diclofenac sodium, ketoprofen, ibuprofen, zomepirac, tolmetin, fenoprofen calcium hydrate, probenecid, gemfibrozil, UDPGA, Cys, DTT 及び alamethicin は Sigma-Aldrich から購入した。Bromfenac は AvaChem Scientific から購入した。Ibuprofen は Toronto Research Chemicals から購入した。Indomethacin 及び repaglinide は和光純薬工業から購入した。Furosemide はナカライテスクから購入した。 $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$  (1,075 Ci/mmol, 10  $\mu\text{M}$ , 水溶液) は PerkinElmer (Boston, MA, USA) から購入した。アセトニトリル (HPLC 用) 及び蒸留水 (HPLC 用) は関東化学から購入した。プールヒト肝ミクロソームは XenoTech から購入した。その他の試薬は、入手可能な最も高い品質の試薬を購入し使用した。

#### 4-2-2 試薬の調製

Diclofenac sodium, ketoprofen, ibuprofen, zomepirac, bromfenac, ibuprofen, tolmetin, indomethacin, fenoprofen calcium hydrate, probenecid, furosemide, repaglinide 及び gemfibrozil のそれぞれ 3.2, 2.5, 2.1, 3.1, 3.3, 1.9, 3.2, 3.6, 5.2, 2.9, 3.3, 4.5 及び 2.5 mg をアセトニトリル/蒸留水 (1,1, v/v) 混液 1 mL に溶解して, 10 mM diclofenac, ketoprofen, ibuprofen, zomepirac, bromfenac, ibuprofen, tolmetin, indomethacin, fenoprofen,

probenecid, furosemide, repaglinide 及び gemfibrozil 溶液を調製した。UDPGA 31.6 mg を蒸留水 1 mL に溶解して、50 mM UDPGA 溶液を調製した（用時調製）。Cys 6.1 mg を蒸留水 1 mL に溶解して、50 mM Cys 溶液を調製した（用時調製）。50 mM Cys 溶液 10  $\mu$ L と蒸留水 990  $\mu$ L を混和して 500  $\mu$ M Cys 溶液を調製し、さらに、この 500  $\mu$ M Cys 溶液 20  $\mu$ L と蒸留水 980  $\mu$ L を混和して 10  $\mu$ M Cys 溶液を調製した（用時調製）。10  $\mu$ M [<sup>35</sup>S]Cys 原液を 10  $\mu$ M Cys 溶液により 50,000 倍希釈して、10  $\mu$ M [<sup>35</sup>S]Cys 溶液を調製した。DTT 82.6 mg をアセトニトリル 50 mL に溶解し、5 mM DTT アセトニトリル溶液を調製した。Alamethicin 5.0 mg をメタノール 200  $\mu$ L に溶解した後、蒸留水にて 100 倍希釈し、250  $\mu$ g/mL alamethicin 溶液を調製した。MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.51 mg を蒸留水 50 mL に溶解して、50 mM MgCl<sub>2</sub> を調製した。K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 及び KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> のそれぞれ 3.48 及び 2.72 g を蒸留水 100 mL に溶解して 200 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 及び KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液を調製した。200 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液及び 200 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液を混合して、pH を 7.4 に調整し、200 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）を調製した。ギ酸 3  $\mu$ L を蒸留水 3 L に添加して 0.1%ギ酸水溶液を調製した。0.1%ギ酸水溶液 40 mL とアセトニトリル 60 mL を混和し、0.1%ギ酸水溶液/アセトニトリル（4,6, v/v）混液を調製した。

#### 4-2-3 [<sup>35</sup>S]Cys トラッピングアッセイ

反応溶液（計 100  $\mu$ L/tube）を下記の組成にて調製した：400  $\mu$ M 評価化合物（diclofenac, ketoprofen, ibuprofen, zomepirac, bromfenac, ibufenac, tolmetin, indomethacin, fenoprofen, probenecid, furosemide, repaglinide 又は gemfibrozil）、2.0 mg protein/mL ヒト肝ミクロソーム、5 mM UDPGA、1  $\mu$ M [<sup>35</sup>S]Cys（21.5 mCi/mmol）、25  $\mu$ g/mL alamethicin、5 mM MgCl<sub>2</sub> 及び 100 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）。なお、反応溶液に含まれるアセトニトリルの濃度は 2%（v/v）とした。反応溶液を 37°C で 2 時間インキュベーション後、5 mM DTT アセトニトリル溶液 300  $\mu$ L 及び酢酸 10  $\mu$ L を添加し反応停止した。反応停止後の混液を遠心分離（13,800 g, 4°C, 5 分間）し、上清を回収した。遠心分離後の残渣に再び 5 mM DTT アセトニトリル溶液 300  $\mu$ L 及び酢酸 10  $\mu$ L を添加後、混和、洗浄し、遠心分離（13,800 g, 4°C, 5 分間）した。得られた上清と先の上清を合わせ、50 mM Cys 溶液 100  $\mu$ L を添加した後、室温、窒素気流下にて蒸発乾固した。蒸発乾固後の残渣を 0.1%ギ酸水溶液/アセトニトリル（4,6, v/v）混液に再溶解し、放射能検出器付き HPLC（radio-HPLC）により測定した。

#### 4-2-4 Radio-HPLC 測定

LC 分析は、Shimadzu Prominence HPLC システム（Shimadzu, Kyoto, Japan）を使用し、以下の分析条件にて実施した。



- Column : InertSustain C18 (3  $\mu$ m, 3.0  $\times$  150 mm, GL Sciences, Tokyo, Japan)
- Mobile phase A : 0.1%ギ酸水溶液
- Mobile phase B : アセトニトリル
- Gradient :

Time (min)	0	5	20	25	26	30
%B	30	30	80	80	30	30

- Flow rate : 0.6 mL/min
- Injection volume : 30  $\mu$ L

放射能検出は, flow scintillation analyzer(FSA)である 525TR(PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を使用し, 以下の分析条件にて実施した. なお, サンプル中にバックグラウンドとして存在する未反応の $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ に由来する放射能は分析の妨害となるため, HPLC 溶出液の最初の 5 分間及び最後の 5 分間は放射能検出器に流入させないように廃棄した.

- Liquid scintillation cocktail : ULTIMA-FLO M (PerkinElmer)
- Flow rate : 1.2 mL/min
- Cell size : 500  $\mu$ L
- Data update time : 6 sec

#### 4-2-5 統計解析

評価した 13 化合物について,  $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$  付加体生成量 (放射能ピーク面積) と Cys 付加体生成量 (MS ピーク面積) との相関解析を行い, Pearson の積率相関係数 ( $r$ ) を算出した. また, 上記相関係数の有意性の検定 (無相関検定) を行った (有意水準  $\alpha = 0.01$ ). 計算には Excel 2016 (Microsoft) を用いた.

### 4-3 結果及び考察

#### 4-3-1 $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ トラッピングアッセイにおける $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ 付加体生成

評価化合物を, UDPGA 及び $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$  存在下, ヒト肝ミクロソームを含む緩衝液 (pH 7.4) 中でインキュベート (37°C, 2 時間) した. 反応停止後のサンプルを放射能検出器付き HPLC (radio-HPLC) により測定し,  $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$  付加体生成量を評価した. 評価化合物としては, 前章と同様, 化学構造及び IDT リスク分類に基づいて選択した

13 薬物を用いた (Table 3 及び Fig. 19).  $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$  トラッピングアッセイにおいて得られた代表的なラジオクロマトグラムを Fig. 23 に示す.

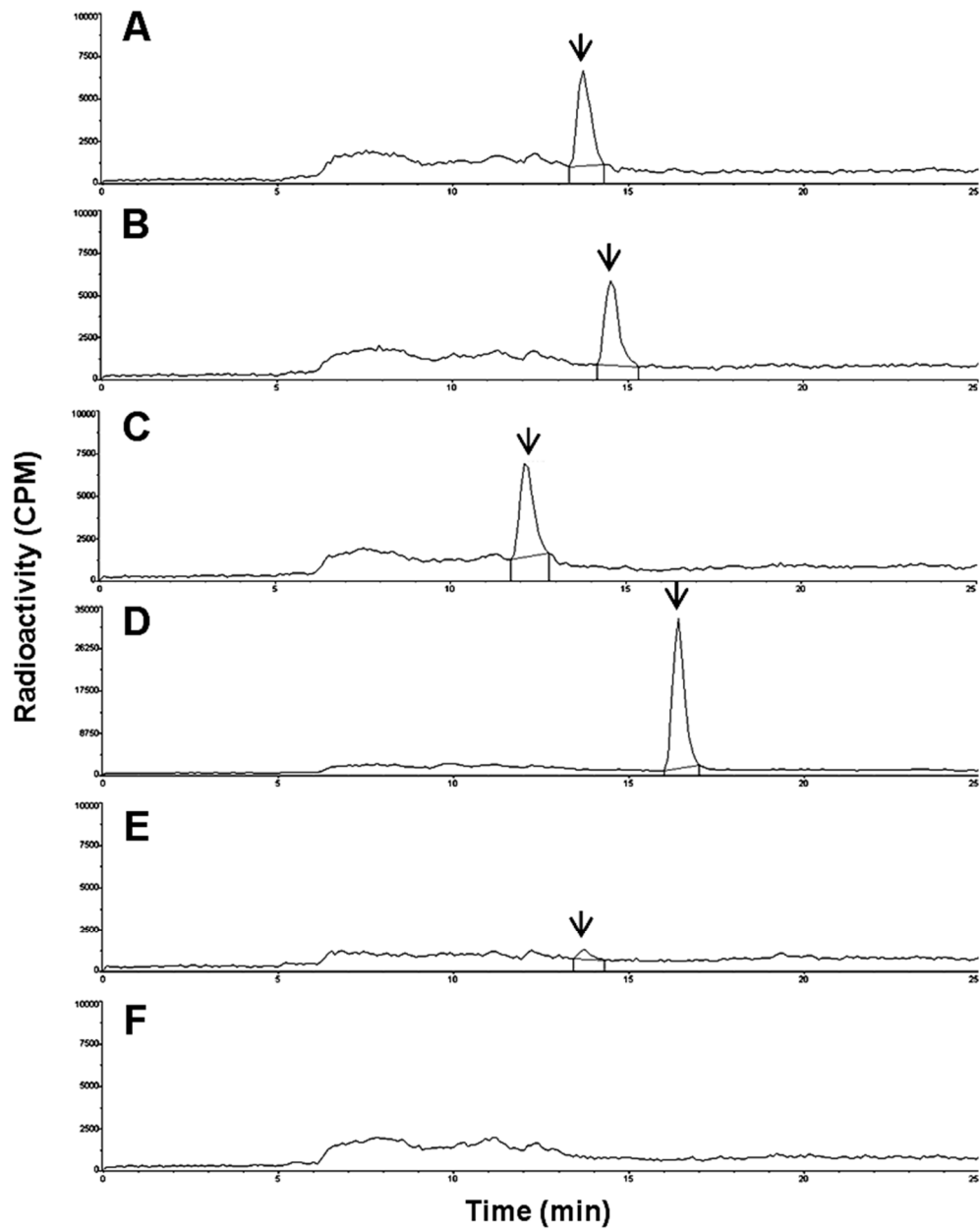


Fig. 23 Representative radiochromatograms of  $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$  adducts formed from various test drugs: (A) zomepirac, (B) ibufenac, (C) tolmetin, (D) diclofenac, (E) probenecid, and (F) furosemide.

今回の測定の結果得られた $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ 付加体生成量（放射能ピーク面積）と前章にて評価した Cys 付加体生成量（MS ピーク面積）をプロットした結果を Fig. 24 に示す。MS 測定においては化合物間の測定感度が異なり、定量的な精確性が低い可能性が考えられたが、今回の放射能測定の結果と MS 測定の結果との間に高い相関（ $r = 0.940$ ,  $P < 0.01$ ）が見られたことから、前章における MS 測定による結果及び考察には一定の妥当性があることが確認できた。

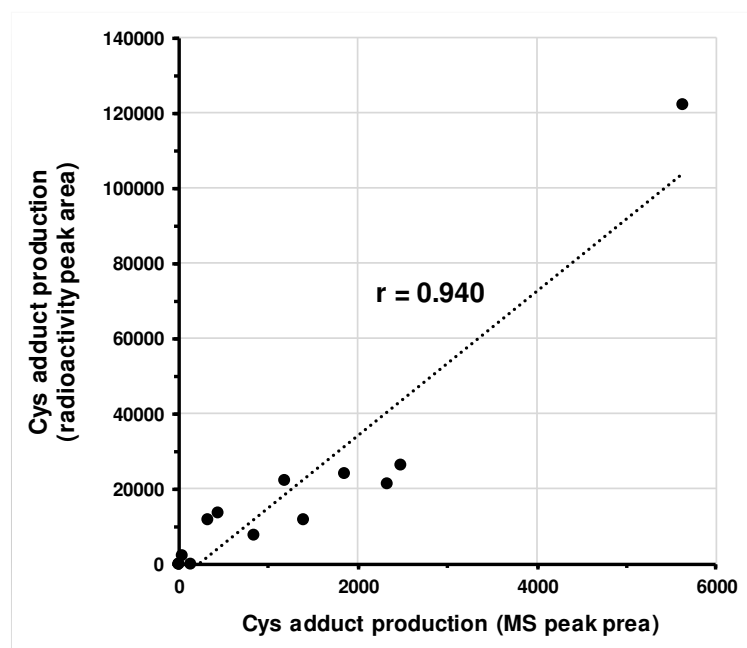


Fig. 24 Correlation between Cys adduct production by MS analysis and by radioactivity analysis ( $r = 0.940$ ,  $P < 0.01$ ).

#### 4-3-2 $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ 付加体生成量と毒性リスク

$[^{35}\text{S}]\text{Cys}$  トラッピングアッセイにより生成した $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$  付加体の生成量（放射能ピーク面積）を評価薬物の化学構造の観点で分類してプロットした（Fig. 25）。付加体生成量は概ね  $\text{AA} > \text{PA} > \text{BA}$  の順で高く、既報<sup>49),53)</sup>と同様の傾向が認められた。反応性が高く毒性リスクも高いとされる AA タイプの薬物はいずれも付加体生成量が高く、とりわけ、diclofenac は極めて高い付加体生成量を示した。一方、反応性が低く毒性リスクも低いとされる BA タイプの薬物では付加体はほとんど生成しなかった。

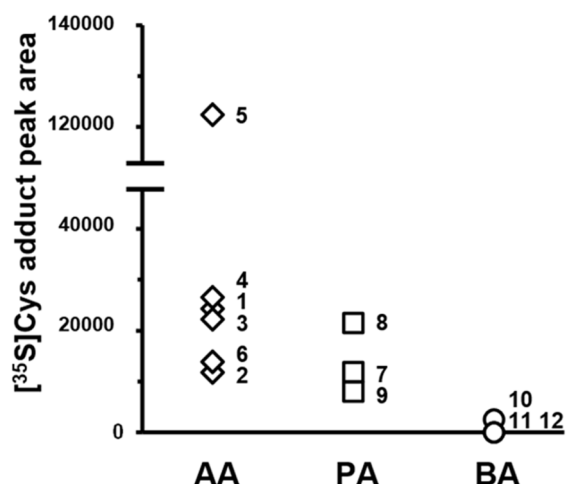


Fig. 25 Relationship between structure and reactivity of AGs. The reactivity of AG means [<sup>35</sup>S]Cys adduct production from carboxylic acid-containing drugs tested. AA: acetic acid derivative, PA: propionic acid derivative, BA: benzoic acid derivative.

続いて、生成した [<sup>35</sup>S]Cys 付加体生成量（放射能ピーク面積）を評価薬物の IDT リスク分類の観点でプロットした結果を Fig. 26 に示す。WDN/WNG に分類される薬物はいずれも高い付加体生成量を示した。一方、SAFE に分類される薬物はいずれも、付加体をほとんど生成しなかった。以上のことから、本評価法により SAFE 薬と non-SAFE 薬を切り分けて評価できる可能性が示された。興味深いことに、probenecid は加水分解法において短い半減期（0.4 時間）を示すことから、毒性リスクが高いと評価されてしまうが、<sup>17),19)</sup> 本法においては付加体生成量が低値であり、SAFE 薬と評価された。プロベネシドの添付文書に警告あるいは禁忌内容として肝障害等の記載は無く、IDT リスクの低い SAFE 薬であると考えられ、本法における probenecid の評価結果と矛盾は無かった。ヒトにおける IDT の発現メカニズムを考慮すると、生成した AG が生体内高分子のアミノ基等の求核性の強い官能基と反応し共有結合を形成することが、副作用発現の 1st step であると考えられる。したがって、加水分解反応は AG の反応性をある程度反映していると考えられるものの、より生理的条件に近い系にてアミノ基への共有結合を直接的に評価できる本法の方がよりヒトにおける IDT リスクを表現できるのではないかと考えられた。

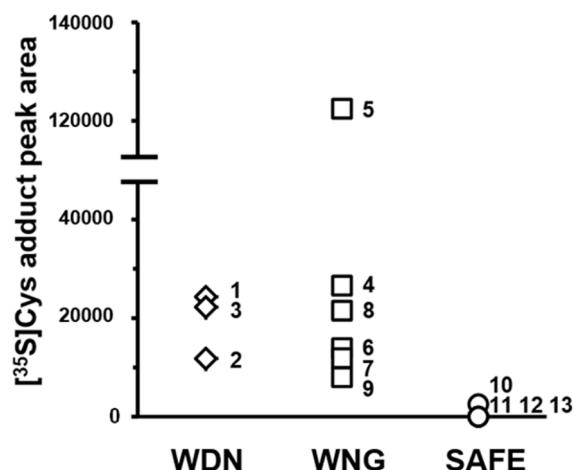


Fig. 26 Relationship between IDT risk category and reactivity of AGs. The reactivity of AGs means [<sup>35</sup>S]Cys adduct production of carboxylic acid-containing drugs tested. WDN: withdrawn, WNG: warning.

本法では，グルクロン酸抱合を介した代謝的活性化の観点から，NSAIDsのIDTリスクを評価することが可能であった。IDT発現の原因となる反応性代謝物の生成経路はグルクロン酸抱合だけではなく，主要な薬物代謝酵素であるCYPを始めとする種々の代謝酵素も関与すると考えられる。例えば，diclofenacはヒトCYP2C9やCYP3A4により水酸化されることが知られているが，反応性代謝物であるキノニンイミン体が生成する可能性が指摘されている。<sup>28)</sup> そのため，薬物のIDTリスクをより精度良く評価するためには，CYP等による酸化代謝も含めた種々の代謝酵素の影響を考慮する必要がある。本法においてトラッピング試薬として用いたCysは，GSHと同様に酸化代謝によって生成するエポキシドやキノンなどの反応性代謝物もトラップすることが可能である。したがって，Cysトラッピング法はCYPやUGTを含めてより幅広い代謝的活性化を評価できる有用なツールになり得ると考えられる。

以上の結果から，[<sup>35</sup>S]Cys付加体生成量を指標とすることにより，カルボキシ基を有する化合物のSAFE及びnon-SAFEを切り分けてIDTリスクを評価できることが明らかとなった（Fig. 26）。本評価法はAG合成標品の使用を必要とせず簡便かつ定量的に評価できることから，創薬初期段階のスクリーニング評価法としての有用性が高いと考えられた。

#### 4-3-3 自社医薬品の評価結果

キッセイ薬品工業株式会社が国内で開発を行い上市したカルボキシ基を有する医薬品として，mitiglinide（製品名：グルファスト，適応：糖尿病治療薬，作用機序：イ

ンスリン分泌促進作用に基づく血糖降下作用), ozagrel (製品名: キサンボン, 適応: 脳虚血症状改善, 作用機序: トロンボキサン合成酵素阻害作用に基づく血小板凝集抑制作用) 及び bezafibrate (製品名: ベザトール, 適応: 高脂血症治療薬, 作用機序: 脂質生成抑制作用に基づく血清脂質低下作用) の 3 剤が挙げられる (Fig. 27). これら 3 剤のいずれも, 添付文書等において, 禁忌や慎重投与となるような肝障害についての記載は無い. これら 3 剤のいずれもカルボキシ基を有することから, グルクロン酸抱合を介した代謝的活性化のリスクを有しているため, [<sup>35</sup>S]Cys トラッピング法により肝毒性発現リスク評価を行った.

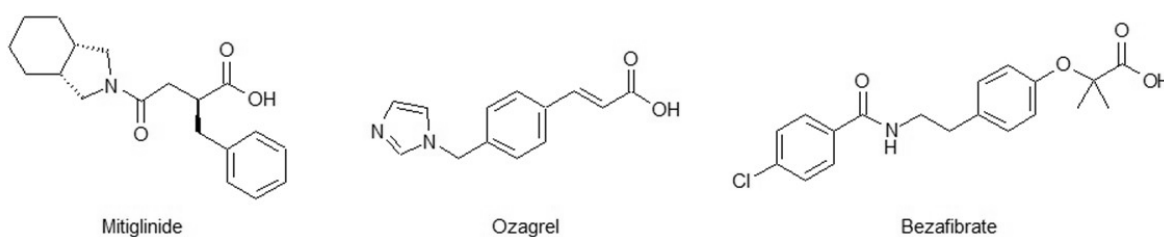


Fig. 27 Structures of mitiglinide, ozagrel, and bezafibrate.

3 薬剤の [<sup>35</sup>S]Cys トラッピングの結果を Fig. 28 に示す. いずれの化合物も付加体をほとんど, あるいは全く生成しなかったことから, SAFE 薬であると判定された. したがって, 本評価系における判定と臨床における副作用発現状況との間に特に矛盾の無い結果が得られた. 今後の医薬品開発においても, 創薬段階から本評価系を活用することにより, 安全性が高く有用性の高い医薬品を上市することに注力して行きたい.

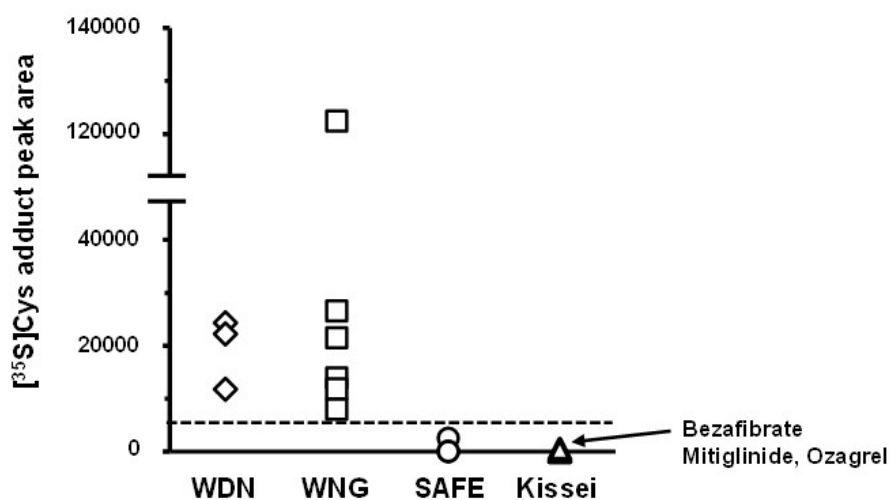


Fig. 28 Relationship between IDT risk category and reactivity of AGs formed from various drugs containing Kissei's drugs (mitiglinide, ozagrel, and bezafibrate). The reactivity of AGs means [<sup>35</sup>S]Cys adduct production of carboxylic acid-containing drugs tested. WDN: withdrawn, WNG: warning, Kissei: Kissei's drugs.

#### 4-4 小括

放射性同位体で標識した [<sup>35</sup>S]Cys をトラッピング試薬として用い、*in vitro* トラッピングアッセイを行った。 [<sup>35</sup>S]Cys に基づく放射能を radio-HPLC にて測定することにより、付加体生成量を定量的に評価する系を構築した。化学構造分類と IDT リスク分類の観点から、13 薬物を評価化合物として選定し、 [<sup>35</sup>S]Cys トラッピングアッセイを行った。

前章では付加体生成量を MS 測定 (MS ピーク面積) により評価したが、MS 測定においては化合物間の測定感度が異なり、定量的な精確性が低い可能性が考えられた。そこで、放射能測定の結果得られた [<sup>35</sup>S]Cys 付加体の放射能ピーク面積を前章にて評価した Cys 付加体の MS ピーク面積と比較した。その結果、両者の間に高い相関が見られたことから、前章における MS 測定による結果及び考察には一定の妥当性があることが確認できた。

次に、 [<sup>35</sup>S]Cys 付加体の生成量 (放射能ピーク面積) を評価薬物の化学構造の観点で分類して比較した結果、付加体生成量は概ね AA > PA > BA の順で高く、既報と同様な構造-反応性相関を示した。続いて、生成した [<sup>35</sup>S]Cys 付加体生成量 (放射能ピーク面積) を評価薬物の IDT リスク分類の観点で比較した結果、WDN/WNG に分類さ

れる薬物はいずれも高い付加体生成量を示した。一方、SAFEに分類される薬物はいずれも付加体をほとんど生成しなかった。以上のことから、本評価法によりSAFE薬とnon-SAFE薬を切り分けて評価できる可能性が示された。

キッセイ薬品工業株式会社が国内で開発を行い上市したカルボキシ基を有する医薬品として3剤（mitiglinide, ozagrel 及び bezafibrate）が挙げられる。これら3剤について、 $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ トラッピング法により肝毒性発現リスク評価を行った。その結果、いずれの化合物も付加体生成が無い、あるいはほとんど付加体を生成しない、という結果が得られたことから、いずれもSAFE薬であると判定された。したがって、本評価系における判定と臨床における副作用発現状況との間に矛盾の無い結果が得られた。今後の医薬品開発においても、創薬段階から本評価系を活用することにより、安全性が高く有用性の高い医薬品を上市することに注力して行きたい。



## 総括

NSAIDsのようなカルボキシ基を有する薬物では、その官能基がUGTによりグルクロン酸抱合を受け、反応性代謝物であるAGが生成される。反応性AGはタンパク質などの生体成分を共有結合的に修飾する、すなわち代謝的活性化を介して毒性発現につながると考えられている。薬物（又は候補化合物）の代謝的活性化を介した毒性発現の予測を行うためには、代謝的活性化に関わっている反応性代謝物を検出することが重要と考えられる。しかしながら、反応性代謝物それ自身は不安定なため安定的に測定することは難しい。そこで、一般的に、GSHのようなトラッピング試薬を用いて薬物の反応性代謝物をトラップすることにより安定な付加体として検出する *in vitro* トラッピングアッセイが行われている。しかしながら、GSHトラッピングアッセイはCYPを介した代謝的活性化の研究においてよく行われているが、UGTによるグルクロン酸抱合を介した代謝的活性化に関してはほとんど行われていない。そこで、本研究では、薬物のグルクロン酸抱合を介した代謝的活性化を *in vitro* トラッピングアッセイにより評価し、ヒトにおける毒性リスクを簡便に評価することを目的とした。

第1章では、グルクロン酸抱合を介した代謝的活性化を評価するためのトラッピング試薬を探索することを目的として、各種Cys誘導体（GSH, NAC, Cys, CG,  $\gamma$ -GC及びS-Me-Cys）を用いたトラッピングアッセイを実施した。UV検出において、トラッピング試薬としてCysとCGを用いた時のみdiclofenacの付加体ピークが検出され、GSHやNACなどのその他Cys誘導体では付加体ピークは検出されなかった。CysやCG付加体はより低感度で汎用性の高いUV検出においてピーク検出が可能であったことから、トラッピング試薬として、CysやCGが極めて有用であることを見出した。さらに、Cysを用いた場合に最もピーク強度の高い付加体を得られたことから、Cysをトラッピング試薬として用いることにより、UGTを介した代謝的活性化によるヒト毒性リスクを評価できる可能性が示された。

第2章では、トラッピングアッセイにおいて生成したCys付加体の構造推定を行った。精密質量測定に基づくMSフラグメント解析や還元剤を用いた化学的アプローチの結果、Cys付加体は、薬物のカルボキシ基とCysのアミノ基がアミド結合を介して結合した構造を有していることが明らかとなった。これら付加体は下記の3段階の反応メカニズムにより生成されると推定された。まず、UGTによりカルボキシ基を有する薬物からエステル結合を有するAGが生成する。次に、AGのエステル結合とCysのチオール基の間でO- to S-アシル転移が生じ、チオエステル結合を有するS-アシルCys付加体が生成する。続いて、S-アシルCys付加体のチオエステル結合とCysのアミノ基との間で分子内S- to N-アシル転移が生じ、安定なアミド結合を有するN-アシ

ル Cys 付加体が生成する。カルボキシ基を有する薬物は、この一連のアシル転移反応により高い反応性を獲得することによりアミノ基と共有結合すると考えられた。

第 3 章では、AG のタンパク質への共有結合メカニズムとしては acylation 経路及び glycation 経路の 2 種類の反応経路が提唱されているが、Cys トラッピング法において生成する Cys 付加体は acylation 付加体に相当する付加体であった。そこで、Cys 添加のタイミング等を変更することにより acylation 付加体及び glycation 付加体の両方を生成する反応条件を検討し、生成する付加体の種類や生成量と毒性リスクとの関係性を検証した。化学構造分類と IDT リスク分類の観点から、13 薬物を評価化合物として選択し、Cys トラッピングアッセイを行った。精密質量測定の結果、いずれの化合物においても、代謝反応前 Cys 添加法では acylation Cys 付加体のみが検出されたが、代謝反応後 Cys 添加法においては両付加体が検出された。まず、代謝反応前 Cys 添加法における acylation 付加体の MS ピーク面積を比較したところ、IDT リスクが高い薬物は付加体生成量も高い傾向にあることが示唆された。次に、代謝反応前 Cys 添加法における acylation 付加体の生成量を AG の MS ピーク面積で補正したところ、IDT リスクをより反映する結果が得られた。続いて、代謝反応前又は代謝反応後 Cys 添加法における両付加体の MS ピーク面積を比較したところ、代謝反応前 Cys 添加法における acylation Cys 付加体が IDT リスクを最もよく反映することが明らかとなった。

第 4 章では、放射性同位体で標識した<sup>[35S]</sup>Cys をトラッピング試薬として用いてトラッピングアッセイを行い、<sup>[35S]</sup>Cys に基づく放射能を radio-HPLC にて測定することにより、付加体生成量を定量的に評価する系を構築した。<sup>[35S]</sup>Cys 付加体の生成量(放射能ピーク面積)を評価薬物の化学構造の観点で分類して比較した結果、付加体生成量は概ね AA > PA > BA の順で高く、既報と同様の構造-反応性相関を示した。続いて、生成した<sup>[35S]</sup>Cys 付加体生成量を評価薬物の IDT リスク分類の観点で比較した結果、WDN/WNG に分類される薬物はいずれも高い付加体生成量を示した。一方、SAFE 薬に分類される薬物はいずれも、付加体をほとんど生成しなかった。以上のことから、本評価法により SAFE 薬と non-SAFE 薬を切り分けて評価できる可能性が示された。最後に、キッセイ薬品工業株式会社が国内で開発を行い上市したカルボキシ基を有する医薬品である 3 薬剤 (mitiglinide, ozagrel 及び bezafibrate) について、<sup>[35S]</sup>Cys トラッピング法により肝毒性発現リスク評価を行った。その結果、いずれも SAFE 薬であると判定され、本評価系における判定と臨床における副作用発現状況との間に矛盾の無い結果が得られた。

以上の結果から、<sup>[35S]</sup>Cys トラッピングアッセイを用いることにより、カルボキシ基を有する医薬品候補化合物のグルクロン酸抱合を介した代謝的活性化及びそのヒト

毒性リスクを定量的に評価することが可能となった。また、本法は AG 代謝物合成標品を必要とすることなく *in vitro* にて簡便に実施できることから、医薬品開発の初期段階である創薬スクリーニング試験における有用性は高いと考えられた。最後に、本法が安全性と有用性の高い医薬品開発の一助となることを祈念する。

## 研究結果の掲載誌

- 1) Harada H., Endo T., Momose Y., Kusama H., A liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for detecting UGT-mediated bioactivation of drugs as their *N*-acetylcysteine adducts in human liver microsomes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**, 564-570 (2009).
- 2) Harada H., Toyoda Y., Endo T., Kobayashi M., Cysteine amide adduct formation from carboxylic acid drugs via UGT-mediated bioactivation in human liver microsomes. *Pharmazie*, **70**, 678-683 (2015).
- 3) Harada H., Toyoda Y., Abe Y., Endo T., Takeda H., Quantitative evaluation of reactivity and toxicity of acyl glucuronides by [<sup>35</sup>S]cysteine trapping. *Chem. Res. Toxicol.*, **32**, 1955-1964 (2019).

## 謝辞

本稿の提出に際し，指導教官を快く受け入れていただき，終始御懇切なる御指導・御鞭撻を賜りました東京薬科大学 薬学部 薬物代謝分子毒性学教室 山折 大 教授に謹んで感謝の意を表します．本稿の作成にあたり，貴重な御指導・御助言を賜りました東京薬科大学 薬学部 薬物動態制御学教室 井上 勝央 教授，分析化学教室 袴田 秀樹 教授，個別化薬物治療学教室 降幡 知巳 教授，薬物代謝分子毒性学教室 小倉 健一郎 准教授，並びに平塚 明 学長に深く感謝の意を表します．

本研究を進めるにあたり，多大な御支援・ご協力を頂きましたキッセイ薬品工業株式会社 代表取締役 神澤 陸雄 会長，代表取締役 降旗 喜男 社長，取締役研究本部長 菊池 伸次 博士，生産本部顧問 草間 寛 博士，神澤医学研究振興財団常務理事 小林 護 博士，薬理研究所参事 武田 裕夫 博士，薬物動態研究所所長 遠藤 拓郎 博士，並びに薬物動態研究所マネジャー 安倍 美和 博士に深く感謝致します．本研究の実験遂行に際し，多大なご協力をいただきましたキッセイ薬品工業株式会社 薬物動態研究所 豊田 泰之 氏並びに薬物動態研究所の諸氏に感謝致します．

最後に，本学位論文執筆に際し常に支えてくれた家族，両親に心から感謝致します．

## 参考文献

- 1) Woolf T.F., Jordan R.A., *J. Clin. Pharmacol.*, **27**, 15-17 (1987).
- 2) Jordan R.A., Woolf T.F., *J. Clin. Pharmacol.*, **27**, 87-90 (1987).
- 3) Josephy P.D., Guengerich F.P., Miners J.O., *Drug Metab. Rev.*, **37**, 575-580 (2005).
- 4) Tephly T.R., Townsend M., Green M.D., *Drug Metab. Rev.*, **20**, 689-695 (1989).
- 5) Tephly T.R., Burchell B., *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**, 276-279 (1990).
- 6) Jansen P.L., Mulder G.J., Burchell B., Bock K.W., *Hepatology*, **15**, 532-544 (1992).
- 7) Rowland A., Miners J.O., Mackenzie P.I., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **45**, 1121-1132 (2013).
- 8) Tourancheau A., Rouleau M., Guauque-Olarte S., Villeneuve L., Gilbert I., Droit A., Guillemette C., *Pharmacogenomics J.*, **18**, 251-261 (2018).
- 9) Hu D.G., Hulin J.U., Nair P.C., Haines A.Z., McKinnon R.A., Mackenzie P.I., Meech R., *Pharmacol. Ther.*, **204**, 1-29 (2019).
- 10) de Leon J., *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **6**, 57-72 (2003).
- 11) Steventon G., *Xenobiotica*, **50**, 64-76 (2020).
- 12) Franklin R.B., *Drug Metab. Dispos.*, **26**, 829 (1998).
- 13) Kerdpin O., Elliot D.J., Mackenzie P.I., Miners J.O., *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 1950-1953 (2006).
- 14) Kaivosaaari S., Finel M., Koskinen M., *Xenobiotica*, **41**, 652-669 (2011).
- 15) Faed E.M., *Drug Metab. Rev.*, **15**, 1213-1249 (1984).
- 16) Spahn-Langguth H., Benet L.Z., *Drug Metab. Rev.*, **24**, 5-47 (1992).
- 17) Ebner T., Heinzl G., Prox A., Beschke K., Wachsmuth H., *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 1143-1149 (1999).
- 18) Bailey M.J., Dickinson R.G., *Chem. Biol. Interact.*, **145**, 117-137 (2003).
- 19) Stachulski A.V., Harding J.R., Lindon J.C., Maggs J.L., Park B.K., Wilson I.D., *J. Med. Chem.*, **49**, 6931-6945 (2006).
- 20) Van Vleet T.R., Liu H., Lee A., Blomme E.A.G., *Toxicol. Lett.*, **272**, 1-7 (2017).
- 21) Smith P.C., Wang C., *Biochem. Pharmacol.*, **44**, 1661-1668 (1992).
- 22) Ding A., Ojingwa J.C., McDonagh A.F., Burlingame A.L., Benet L.Z., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3797-3801 (1993).
- 23) Liu J.H., Marquez C.D., Weintraub S.T., Smith P.C., *Pharm. Res.*, **15**, 343-346 (1998).
- 24) Wang M., Dickinson R.G., *Drug Metab. Dispos.*, **26**, 98-104 (1998).
- 25) Chiou Y.J., Tomer K.B., Smith P.C., *Chem. Biol. Interact.*, **121**, 141-159 (1999).
- 26) Dong J.Q., Smith P.C., *Drug Metab. Dispos.*, **37**, 2314-2322 (2009).
- 27) Boelsterli U.A., Zimmerman H.J., Kretz-Rommel A., *Crit. Rev. Toxicol.*, **25**, 207-235 (1995).

- 28) Boelsterli U.A., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **192**, 307-322 (2003).
- 29) Regan S.L., Maggs J.L., Hammond T.G., Lambert C., Williams D.P., Park B.K., *Biopharm. Drug Dispos.*, **31**, 367-395 (2010).
- 30) U.S. Food and Drug Administration. "Safety Testing of Drug Metabolites.": <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/safety-testing-drug-metabolites>, cited 5 March, 2020.
- 31) Bolze S., Bromet N., Gay-Feutry C., Massiere F., Bouliou R., Hulot T., *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 404-413 (2002).
- 32) Li A.P., *Chem. Biol. Interact.*, **142**, 7-23 (2002).
- 33) Fukano M., Amano S., Sato J., Yamamoto K., Adachi H., Okabe H., Fujiyama Y., Bamba T., *Hum. Pathol.*, **31**, 250-253 (2000).
- 34) Murphy E.J., Davern T.J., Shakil A.O., Shick L., Masharani U., Chow H., Freise C., Lee W.M., Bass N.M., *Dig. Dis. Sci.*, **45**, 549-553 (2000).
- 35) He K., Talaat R.E., Pool W.F., Reily M.D., Reed J.E., Bridges A.J., Woolf T.F., *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 639-646 (2004).
- 36) McClain C.J., Price S., Barve S., Devalarja R., Shedlofsky S., *Curr. Gastroenterol. Rep.*, **1**, 42-49 (1999).
- 37) Roberts D.W., Bucci T.J., Benson R.W., Warbritton A.R., McRae T.A., Pumford N.R., Hinson J.A., *Am. J. Pathol.*, **138**, 359-371 (1991).
- 38) Hart S.G., Cartun R.W., Wyand D.S., Khairallah E.A., Cohen S.D., *Fundam. Appl. Toxicol.*, **24**, 260-274 (1995).
- 39) Cohen S.D., Pumford N.R., Khairallah E.A., Boekelheide K., Pohl L.R., Amouzadeh H.R., Hinson J.A., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **143**, 1-12 (1997).
- 40) Joshi E.M., Heasley B.H., Chordia M.D., Macdonald T.L., *Chem. Res. Toxicol.*, **17**, 137-143 (2004).
- 41) Castro-Perez J., Plumb R., Liang L., Yang E., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 798-804 (2005).
- 42) Ma S., Subramanian R., *J. Mass Spectrom.*, **41**, 1121-1139 (2006).
- 43) Sleno L., Staack R.F., Varesio E., Hopfgartner G., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**, 2301-2311 (2007).
- 44) Aldini G., Altomare A., Baron G., Vistoli G., Carini M., Borsani L., Sergio F., *Free Radic. Res.*, **52**, 751-762 (2018).
- 45) Grillo M.P., Benet L.Z., *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 1033-1040 (2001).
- 46) Grillo M.P., Hua F., Knutson C.G., Ware J.A., Li C., *Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 1410-1417 (2003).
- 47) Faergeman N.J., Knudsen J., *Biochem. J.*, **323**, 1-12 (1997).

- 48) Franke J., Hertweck C., *Cell Chem. Biol.*, **23**, 1179-1192 (2016).
- 49) Wang J., Davis M., Li F., Azam F., Scatina J., Talaat R., *Chem. Res. Toxicol.*, **17**, 1206-1216 (2004).
- 50) Iwamura A., Ito M., Mitsui H., Hasegawa J., Kosaka K., Kino I., Tsuda M., Nakajima M., Yokoi T., Kume T., *Toxicol. In Vitro*, **30**, 241-249 (2015).
- 51) Zhang Q., Ames J.M., Smith R.D., Baynes J.W., Metz T.O., *J. Proteome Res.*, **8**, 754-769 (2009).
- 52) Martins S.I., van Boekel M.A., *Food Chem.*, **90**, 257-269 (2005).
- 53) Sawamura R., Okudaira N., Watanabe K., Murai T., Kobayashi Y., Tachibana M., Ohnuki T., Masuda K., Honma H., Kurihara A., Okazaki O., *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 1857-1864 (2010).