

氏名（本籍）	<small>はらだ ひろし</small> 原田 浩史（山梨県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 375 号
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 18 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	（主査）教授 山折 大 教授 井上 勝央 教授 袴田 秀樹 教授 降幡 知巳

論文内容の要旨

【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・分解を受けて解毒される。代表的な薬物代謝反応の一つとして、第 2 相代謝反応であるグルクロン酸抱合が挙げられる。典型的なグルクロン酸抱合反応では、グルクロン酸転移酵素（UDP-glucuronosyltransferase, UGT）により対象物質のヒドロキシ基にグルクロン酸が導入され、エーテル型のグルクロン酸抱合体が生成する。カルボキシ基もグルクロン酸抱合を受けるが、その結果、エステル型のグルクロン酸抱合体である *acyl glucuronide* (AG) が生成する。通常のグルクロン酸抱合体が有するエーテル結合は化学的に安定であるが、AG のエステル結合は化学的に不安定であり高い反応性を有する。生理的条件下の水溶液中においては、AG の加水分解、異性化あるいは分子内アシル転移反応が容易に進行する。さらには、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。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）。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。2008 年にアメリカ食品医薬品局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, 「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. 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, glutathione (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 cytochrome P450 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で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.

【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

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 L-cysteine (Cys) 誘導体 [Cys , L-cysteinyl-glycine (CG), GSH, N-acetyl-L-cysteine (NAC), N-L- γ -glutamyl-L-cysteine (γ -GC) 及び S-methyl-L-cysteine (S-Me-Cys)] を用いたトラッピングアッセイを実施し, HPLC-PDA (UV) 法により測定した. 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 を選択した. UV 検出 (225 nm) において, Cys と CG を用いた時のみ diclofenac の付加体ピークが検出され, GSH などその他 Cys 誘導体では付加体ピークは検出されなかった (Fig. 1). グルクロン酸抱合を介した代謝的活

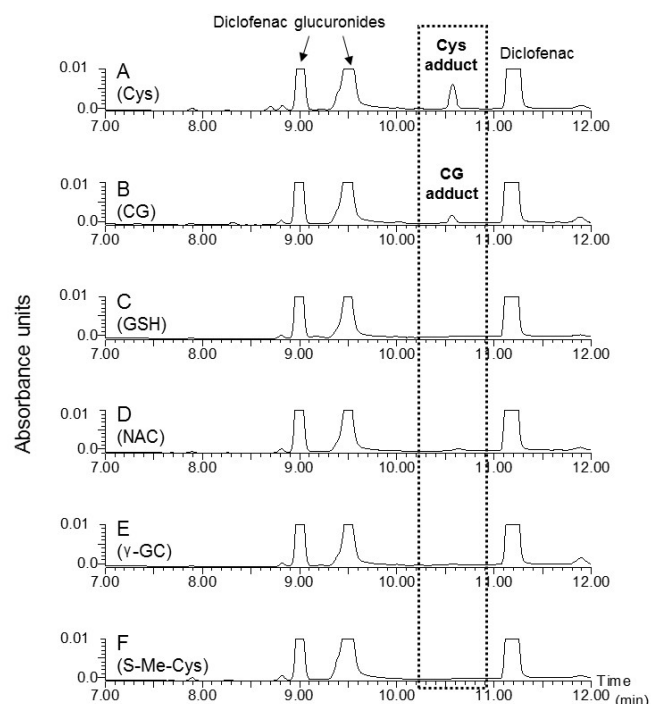


Fig. 1 UHPLC-PDA-UV chromatograms (at 225 nm) of human liver microsomal incubations of diclofenac with UDP-glucuronic acid and Cys derivatives.

性化の評価において GSH トラッピングアッセイが用いられない原因はこのためであることが推察された。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が得られたことから、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

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。精密質量分析を用いた 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 (Fig. 2)。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って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。

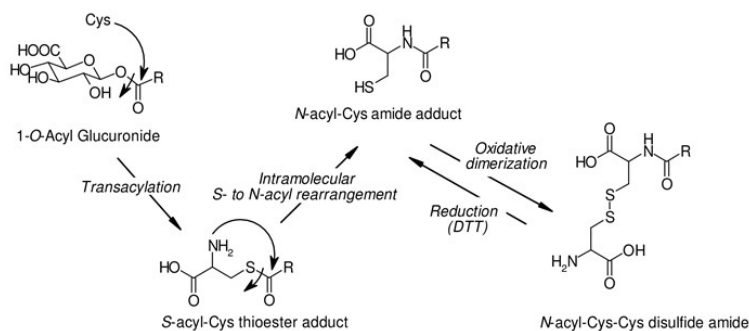


Fig. 2 Proposed reaction pathways for the formation of an N-acyl-Cys amide adduct from AG (R = xenobiotic moiety).

【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

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 glycation 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生成量と毒性リスクとの関係性について検証した。化学構造分類と idiosyncratic

toxicity (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 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 acylation 付加体及び glycation 付加体の両方が検出された。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 (AG の MS ピーク面積による補正あり) 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 IDT リスクを最もよく反映することが明らかとなった (Fig. 3)。

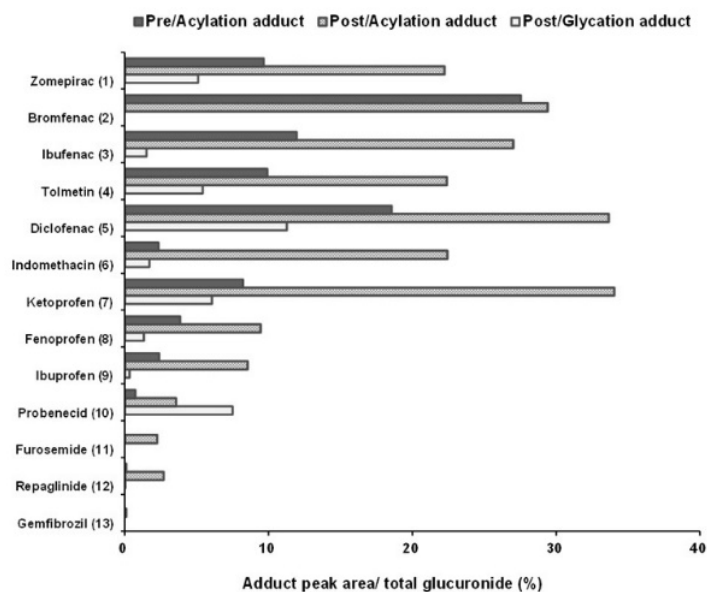


Fig. 3 Acylation/glycation Cys adduct production of test drugs in the Cys pre-/post-addition procedure.

【第4章】 $[^{35}\text{S}]$ 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

放射性同位体で標識した $[^{35}\text{S}]$ 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、 $[^{35}\text{S}]$ 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。 $[^{35}\text{S}]$ Cys付加体の生成量を評価薬物の毒性リスク分類の観点で比較した結果、撤退/警告薬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 (Fig. 4)。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。さらに、キッセイ薬品工業株式会社が国内で開発・上市したカルボキシ基を有する医薬品で、添付文書等に禁忌や慎重投与となるような肝障害の記載がない3薬剤 (mitiglinide, ozagrel 及び bezafibrate) について、本アッセイ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 (Fig. 4)。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。

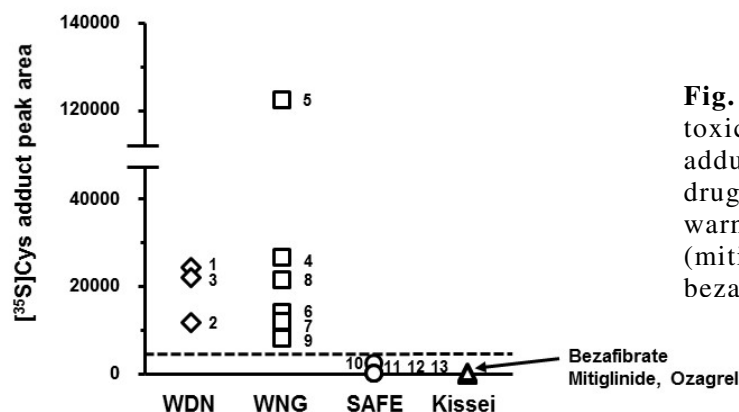


Fig. 4 Relationship between toxicity risk category and [³⁵S]Cys adduct production of various drugs. WDN: withdrawn, WNG: warning, Kissei: Kissei's drugs (mitiglinide, ozagrel, and bezafibrate).

【総括】

本研究では、トラッピング試薬として[³⁵S]Cysを用いた *in vitro* トラッピング法を構築し、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、本法は反応性代謝物 AG の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。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., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**, 564-570 (2009).
- 2) Harada H., Toyoda Y., Endo T., Kobayashi M., *Pharmazie*, **70**, 678-683 (2015).
- 3) Harada H., Toyoda Y., Abe Y., Endo T., Takeda H., *Chem. Res. Toxicol.*, **32**, 1955-1964 (2019).

論文審査の結果の要旨

原田浩史氏の博士学位申請論文は、グルクロン酸抱合を介して生成する薬物の反応性代謝物アシルグルクロナイド (AG) のヒトにおける毒性予測を簡便かつ精度よく行うための *in vitro* トラッピングアッセイ法の開発を目的に行われた研究である。

第1章では、カルボキシ基を有する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トラッピング試薬を探索するため、酵素源としてヒト肝ミクロソーム、評価化合物として肝毒性リスクのあるジクロフェナクを用いて、6種類のL-システイン (Cys) 誘導体がジクロフェナクのAGと付加体を生成するか否か検討した。その結果、シトクロムP450などによる代謝的活性化を検出するためのトラッピング試薬として最も汎用されているグルタチオンではジクロフェナクAGとの付加体生成は検出されず、CysとL-システイニル-グリシンのみが付加体を生成することが明らかとなった。これらの付加体の生成は、LC-MS/MSに比べて検出感度の低いUHPLC-PDA (UV) 法においても検出可能であった。特に、Cysはピーク面積が最も大きかったことから、AGのトラッピング試薬として有用である可能性が見出された。

第2章では、前章のトラッピングアッセイで生成したCys付加体について、精密質量測定を用いたMSフラグメント解析および還元剤ジチオスレイトールを用いた化学的アプローチに基づいて、その構造推定を行った。その結果、Cys付加体は評価化合物のカルボキシ基とCysのアミノ基がアミド結合を形成した構造を有していることが示された。この付加体の生成メカニズムとして、グルクロン酸抱合によって生成したAGのエステル結合にCysのチオール基がアタックしてS-アシルCys付加体が生成し、その後、Cysの分子内アシル転移が生じ、安定なアミド結合を有するN-アシルCys付加体が生成するものと推定された。

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提唱されているacylation経路およびglycation経路によって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について検証した。その結果、化学構造分類とidiosyncratic toxicity (IDT) リスク分類の観点から選択された13種類の薬物を用いたとき、acylation経路によって生成するCys付加体の生成量 (MSピーク面積) がIDTリスクを最もよく反映することが示された。

第4章では、Cys付加体の生成量をより定量的に評価するため、 $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ 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radio-HPLCにて測定する系を構築した。前章で用いた13種類の薬物の $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ 付加体生成量を比較した結果、IDTリスクの高い薬物はいずれも高い付加体生成量を示したが、IDTリスクの低い薬物では付加体はほとんど生成しなかった。このことから、本評価法により、AGを生成する薬物の中でIDTリスクの高い薬物と低い薬物を判別評価できる可能性が示された。

以上、本申請論文では、カルボキシ基を有する薬物の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するための $[^{35}\text{S}]\text{Cys}$ トラッピングアッセイ法を構築することに成功した。本評価法は化学的に不安定なAGの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、ヒトにおけるAGの毒性予測を簡便かつ精度よく行うための方法として高い有用性を示すものと期待される。したがって、本論文は、博士 (薬学) の学位論文として相応しいものと判断

する。