

令和元年5月10日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07911

研究課題名(和文)フルオラス相互作用を利用した反応性代謝物の選択的トラッピング同定法の開発

研究課題名(英文) Development of selective trapping method for reactive metabolites by fluorous interaction

研究代表者

山口 政俊 (Yamaguchi, Masatoshi)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：50117280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、医薬品の反応性代謝物の同定法であるグルタチオントラッピング法を改善すべく、フルオラス相互作用(パーフルオロアルキル鎖同士の特異な親和性)を利用する方法について開発を行った。本法において、反応性代謝物をグルタチオンによりトラップした後、オキサゾロン環を経由する反応によって、GSHがもつ γ -カルボン酸を選択的にフルオラスアミン試薬によって誘導体化した。得られた誘導体は、フルオラス相互作用によってLC-MS/MSにより選択的に分析され、また、その検出感度は未誘導体のものと比較して極めて優れたものであった。今後、本法を応用し、様々な医薬品反応性代謝物の同定に利用されることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医薬品の開発研究段階で生体内における反応性代謝物の存在を把握しておくことは、上市後の重大な副作用リスクを回避する上で極めて重要視されている。本研究では、これまでに開発・利用されてきた方法を改良し、医薬品の反応性代謝物をより高感度かつ高選択的に検出できる方法を開発した。今後、これまでの方法では検出できなかった既知あるいは未知の医薬品反応性代謝物の分析への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, utilizing fluorous interaction which is affinity between perfluoroalkyl compounds, an improved method for identification of reactive metabolites by glutathione trapping has been developed. This method includes selective perfluoroalkylation of γ -carboxyl group of glutathione-trapped reactive metabolites with fluorous amine reagent through oxazolone chemistry. The obtained derivative could be analyzed selectively and sensitively with LC-MS/MS comparing with conventional methods. The proposed method will be useful for the identification of reactive metabolites in various pharmaceutical product.

研究分野：分析化学

キーワード：グルタチオントラッピング フルオラス相互作用 医薬品反応性代謝物 液体クロマトグラフィー/質量分析計

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内に投与された薬物は、多くの場合、体外へと排泄される過程において様々な代謝を受ける。その代謝は解毒を目的とした生体防御機構ではあるが、ある種の薬物からは、化学的反応性の高い代謝物（反応性代謝物）が生成されることによって、肝毒性、アレルギー、特異体質性毒性などの重篤な副作用を引き起こすことがあることが知られている。その原因の多くは、cytochrom P450 に代表される薬物代謝酵素によって生成されるエポキシド、キノン類、イミン、ニトロソ化合物やアシルグルクロニドなどの求電子性化合物であり、医薬品の開発研究段階でその存在を把握しておくことが重要視されている。一般に、反応性代謝物を直接的に同定することは困難である。そのため、その測定には、グルタチオン（GSH）に代表される求核試薬によるトラッピング法が汎用される。この方法ではまず、*in vitro* の系で対象薬物をヒト肝ミクロソーム中 NADPH の存在下インキュベートし、酸化代謝により親電子性の反応性代謝物を生成させる。同試料に求核剤を添加しておくこと、それらは求核付加体となり、LC-MS/MS などによって検出・同定することが可能となる。これまでに、GSH を用いたトラッピング法として、安定同位体 (*Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23** (2009) 843)、四級アンモニウム体 (*Chem. Res. Toxicol.*, **19** (2006) 480) あるいは蛍光団 (*Chem. Res. Toxicol.*, **18** (2005) 896) による標識化体の利用例が報告されている。しかしながら、そのような既存の GSH トラッピング法は、反応性代謝物の「検出」には優れているものの、「分離」という点においては未だ改善の余地がある。すなわち、反応性代謝物同定結果の偽陽性・偽陰性を減少させ、その信頼性を向上させるには、妨害となり得る試料中夾雑物から「反応性代謝物のみを選択的に分離」させる必要があり、そのための画期的な方法論の開発が強く求められている。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、フルオラスと呼ばれるパーフルオロアルキル鎖同士がもつ特異的な親和性を利用した誘導体化法を開発し、測定対象物の極めて選択的な LC 分析に成功している (例えば、*Anal. Chem.*, **84** (2012) 8407 など)。本法の原理は、測定対象物質にパーフルオロアルキル基を導入（誘導体化）し、得られた誘導体のみをパーフルオロアルキル基修飾シリカカラム（フルオラスカラム）によって選択的に保持させるといったことに基づく。本法では、非パーフルオロアルキル誘導体は同カラム上にほとんど保持されないため、対象の誘導体のみを極めて選択的に測定することが可能である (図 1)。本研究

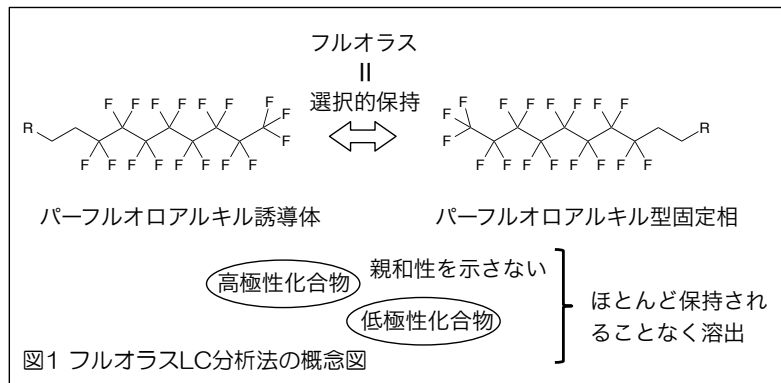


図1 フルオラスLC分析法の概念図

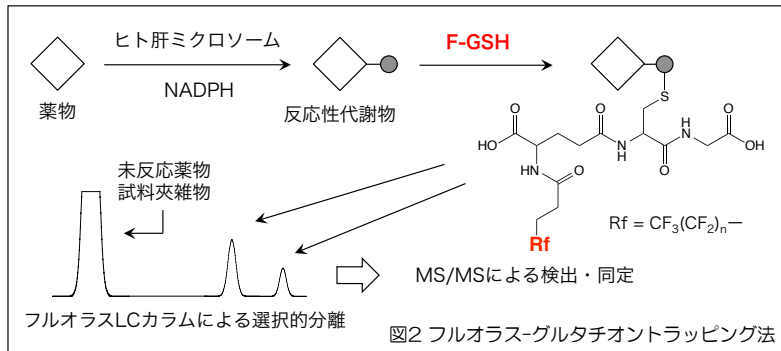


図2 フルオラス-グルタチオントラッピング法

では、この「フルオラス誘導体化法」の概念を反応性代謝物のトラッピング法に導入した方法論の開発を行うことを目的とした。本法の原理を図 2 に示す。本法では、ヒト肝ミクロソーム中にて得られた反応性代謝物を、パーフルオロアルキル基を導入したグルタチオン（F-GSH）などのトラッピング試薬にて捕集する。その後、フルオラス LC カラムにて選択的に保持・分離させ、MS/MS にて検出・同定する。上述のとおり、非フルオラス体である未反応薬物など試料夾雑成分は同カラム上にほとんど保持されることなく溶出され、フルオラス化された反応性代謝物と極めて明確に分離される。そのため本法は、偽陽性・偽陰性の発生を減少せしめ、既知のみならず未知の反応性代謝物についても、信頼性の高い同定結果の提供できるものと考えた。

3. 研究の方法

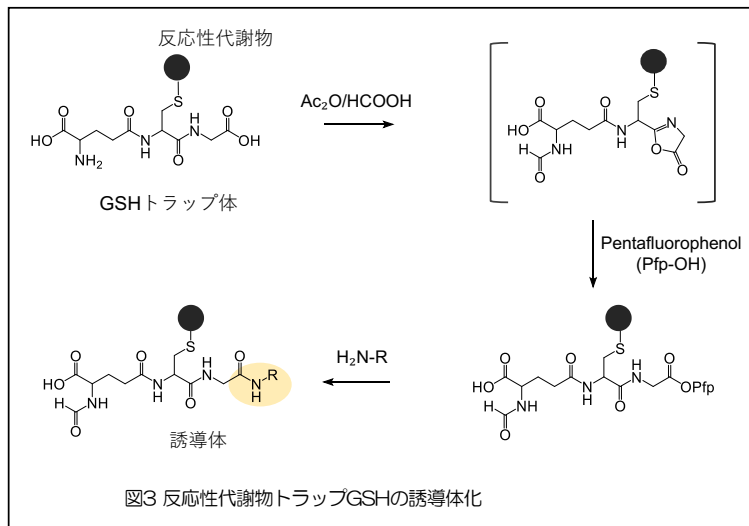
(1) フルオラス-GSH トラップ試薬の合成

本研究ではまず、「フルオラスの選択性を利用した反応性代謝物の同定法の構築」という目的を達成すべく、パーフルオロアルキル化された GSH トラップ試薬の合成を試みた。フルオラスの親和性の強さは、パーフルオロアルキル鎖長によって左右される。一般に、アルキル鎖が C4～C8（フッ素数として 9～17 個）までのものをライトフルオラス (light fluorous)、それ以上のものをヘビーフルオラス (heavy fluorous) と呼ぶ。ヘビーフルオラス体はフルオラス性が極めて

て高く、選択性の向上を期待できるが、その反面、溶解性の問題から生体試料分析への適用は必ずしも望ましくはない。そのため本研究では、ライトフルオラス鎖 (C8) を付加させた GSH トラップ試薬を合成することとした。さらに合成したフルオラス-GSH トラップ試薬の反応性を、適当なモデル化合物を用いて確認するとともに、LC-MS/MS 測定を実施してラベル化体の最適な測定条件を設定することとした。

(2) GSH とラッピング体のフルオラス誘導体化

上述のフルオラス-GSH トラップ試薬には、溶解性などの問題から、反応性代謝物のトラップ剤として採用できない可能性があったことから、通常の GSH によって反応性代謝物をトラップした後、フルオラス試薬にて誘導体化する方法の開発を試みた。本反応には、GSH トラップ体の構造変化を最小にするべく、GSH の α -カルボキシル基のみを選択的に誘導体化することとした。本反応により、GSH の α -カルボキシル基は、オキサゾロン環を經由することで、選択的にフルオラス試薬によって誘導体化される (図 3)。まずは、本誘導体化反応条件の最適化を行うとともに、LC-MS/MS 条件を整え、さらに実試料へと応用することとした。



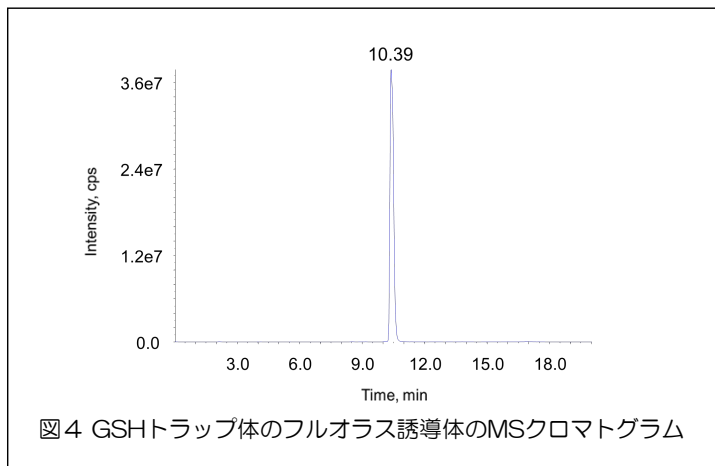
4. 研究成果

(1) フルオラス-GSH トラップ試薬の合成

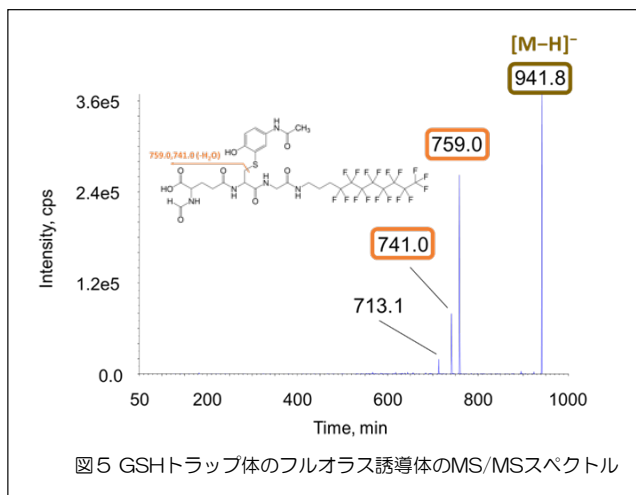
種々の方法を検討したところ、GSH のフルオラス化には、フルオラスカルボン酸試薬 (tridecafluorononanoic acid) を用いたアミド化反応が適していた。縮合剤 DMT-MM の存在下、フルオラスカルボン酸を GSH と反応させたところ、フルオラス-GSH を得ることができた。さらに、得られた F-GSH を用いて、反応性代謝物のモデルとして 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) との反応を行ったところ、CDNB のトラッピングが可能であることとともに、得られた反応物のフルオラス固相抽出 (F-SPE) による精製と LC-MS/MS による分析も可能であることを確認した。しかしながら、フルオラス-GSH の水への溶解性等が原因と思われる反応性の低さから、実用性については疑問が残る結果であった。

(2) GSH とラッピング体のフルオラス誘導体化

フルオラス-GSH の反応性代謝物への反応性の低さを鑑み、まずは通常の GSH によって反応性代謝物をトラッピングした後、そのトラップ体をフルオラス試薬によって誘導体化する手法の開発を試みた。本法では、GSH トラップ体の構造変化を最小にするべく、GSH の α -カルボキシル基のみを選択的に誘導体化することとした。種々の検討の結果、既報に従って、無水酢酸、ギ酸、ペンタフルオロフェノールを用いて得られるオキサゾロン環を經由させる方法を用いることで、GSH の α -カルボン酸のみをフルオラスアミン試薬によって選択的に誘導体化することが可能であった。本反応は、反応性代謝物側には何ら影響を与えることなく GSH の α -カルボキシル基のみを誘導体化することが可能であり、得られた誘導体は、フルオラス固相抽出 (F-SPE) やフルオラス LC にて選択的に抽出や分析することが可能であった。本法により、アセトアミノフェンの代謝物であるキノン体を GSH トラップし、その後誘導体化して得られた試料の MS クロマトグラムを図 4 に示す。本法によって得られた誘導体は、LC カラムに良好に保持され、クロマトグラム上に単一のピークを与えた。さらに、クロマ



トグラム上のピーク位置における MS/MS スペクトルを取得したところ、目的の誘導体が得られていることを確認することができた (図5)。また、本誘導体の MS による検出感度は、未誘導体のものと比較して、少なくとも5倍程度高く、本法が選択性のみならず、検出面においても優れていることが示唆された。現在、様々な医薬品反応性代謝物への適用や、実際のヒト肝マイクロソーム中における医薬品の既知・未知代謝物の同定などを試みているところである。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計4件)

- ① E. Tamashima, T. Hayama, H. Yoshida, O. Imakyure, M. Yamaguchi, H. Nohta, Direct Tandem Mass Spectrometric Analysis of Amino Acids in Plasma Using Fluorous Derivatization and Monolithic Solid-phase Purification, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 115 (2015) 201-207.
- ② Y. Sakaguchi, J. Ikenaga, H. Yoshida, T. Hayama, M. Itoyama, K. Todoroki, O. Imakyure, M. Yamaguchi, H. Nohta, Selective and sensitive liquid chromatographic determination method of 5-hydroxyindoles with fluorous and fluorogenic derivatization, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 114 (2015) 348-354.
- ③ T. Hayama, E. Kiyokawa, H. Yoshinda, O. Imakyure, M. Yamaguchi, H. Nohta, Fluorous-assisted metal chelate affinity extraction technique for analysis of protein kinase activity, *Talanta*, 156-157 (2016) 1-5.
- ④ E. Kiyokawa, T. Hayama, H. Yoshida, M. Yamaguchi, H. Nohta, Fluorous-assisted Metal Chelate Affinity Extraction for Nucleotides Followed by HILIC-MS Analysis, *J. Chromatogr. B*, 1074-1075 (2018) 86-90.

〔学会発表〕 (計5件)

- ① 玉嶋江莉奈, 巴山 忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田 均, 山口政俊, フルオラス相互作用を利用したアミノ酸のタンデムマス分析と病態モデルマウス試料への適用, 第13回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム (2015)
- ② 久保田桃子, 清川恵奈, 巴山 忠, 川見祐介, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田 均, マルチフルオラス誘導体化による脳内ペプチド類の選択的 LC-MS/MS 分析, 第34回九州分析化学若手の会 夏季セミナー (2016)
- ③ 清川恵奈, 久保田桃子, 巴山 忠, 川見祐介, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田 均, 脳内ペプチド類の選択的 LC-MS/MS 分析法の開発とマウス脳組織への応用, 第33回日本薬学会九州支部大会 (2016)
- ④ 清川恵奈, 巴山 忠, 川見祐介, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田 均, 金属固定化フルオラス試薬を用いたリン脂質の選択的抽出法の開発, 日本薬学会第137年会 (2017)
- ⑤ 清川恵奈, 竹下阿紗子, 巴山 忠, 古賀鈴依子, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田 均, オンライン-フルオラス誘導体化によるクルクミンの高感度 LC-MS/MS 分析, 日本分析化学会第66年会 (2017)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 巴山 忠

ローマ字氏名: Tadashi Hayama

※ 科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。