

令和元年6月7日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08379

研究課題名(和文)肝毒性を示す医薬品の代謝活性化機構の解明とそれを基盤にした改良型医薬品の創製

研究課題名(英文)Strategic drug design to avoid metabolic activation of hepatotoxic drugs

研究代表者

大江 知之(Ohe, Tomoyuki)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・准教授

研究者番号：30624283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：医薬品が代謝を受け反応性代謝物が生成する「代謝活性化」は急性あるいは特異体質性毒性の原因となり、実際に代謝活性化による肝毒性のために使用が制限されたり市場から撤退した薬もある。本研究では、肝毒性を示す3つの医薬品(ベンズプロマロン、ジクロフェナク、ネビラピン)に着目し、その代謝活性化機構に基づいて安全性の高い改良型医薬品を創製することを目指した。まず、研究に先立って反応性代謝物を定量的かつ効率的に検出できる新規蛍光標識トラッピング剤の開発に成功した。次に、各医薬品について代謝活性化を抑えた複数の誘導体を合成し、そのうちいくつかは薬効を維持した上で代謝活性化を回避できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

まず、本研究で開発した新規蛍光標識トラッピング剤は、今後製薬企業の創薬研究で毒性リスクの低い候補品を創製するための評価系として使用される可能性が高く、将来的に安全性の高い医薬品の創製に貢献できるものと考えられる。また、今回扱った医薬品のうち、特にベンズプロマロンについては有力な候補品の創製に成功しており、この化合物がリード化合物となり新規高尿酸血症治療薬の創製に繋がるかも知れない。また、本研究で取り入れた方法論、すなわち、既存薬の毒性を有機化学的な観点から捉えそれを基に低毒性医薬品を創製する試みは、新薬の創製が難しい現在、既存薬の骨格を有効利用する創薬戦略の一つになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Metabolic activation of drugs to chemically reactive metabolites that are capable of modifying cellular macromolecules results in acute and/or idiosyncratic toxicities. Some marketed drugs are known to generate reactive metabolites and exhibit hepatotoxicity as side effects. These drugs must be carefully used on medication or withdrawn from the market in the worst-case. The current research is aiming to develop improved medicines to reduce the formation of reactive metabolites on the basis of the activation mechanism of three hepatotoxic drugs (benzbromarone, diclofenac, nevirapine).

First of all, we succeeded in the development of a novel fluorescent trapping agent to quantitatively and effectively detect reactive metabolites. Next, we designed and chemically synthesized multiple derivatives of the three drugs to avoid their metabolic activation. It was found that some of the derivatives are not subject to metabolic activation with remaining pharmacological activities as expected.

研究分野：創薬化学

キーワード：薬物代謝 代謝活性化 反応性代謝物 トラッピング剤 ベンズプロマロン ジクロフェナク ネビラピン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医薬品が代謝を受け反応性代謝物が生成する、すなわち「代謝活性化」は肝毒性をはじめとする深刻な毒性の原因になるので、最近の創薬研究では、リスク回避の観点から初期の段階から反応性代謝物の生成を回避する化合物最適化を行っている。稀にしか発生しないが深刻な結果を招く特異体質性毒性は医薬品の自主回収や使用制限に結びつき、企業にとっては死活問題となるからである。一方、市販医薬品の中にも代謝活性化を受け、肝毒性を惹起するものが知られており、各国の市場から撤退した薬もある。こうした薬のいくつかに関しては代謝活性化機構解明のための研究が行われてきたが、未解明の医薬品も多い。最近申請者は、自らがかつて発見した新規代謝活性化経路をもとに、重篤な肝毒性が報告されている高尿酸血症治療薬ベンズプロマロンの代謝活性化機構を明らかにした。そこで、さらなる展開として、この代謝活性化機構に基づきベンズプロマロンの肝毒性を抑えた合成展開をする。また、肝毒性が問題となっている他の医薬品にも着目し、その代謝活性化を最小限の構造変換により抑えることで、低毒性医薬品を創製することを目指すこととした。

2. 研究の目的

本研究では、主にベンズプロマロン、抗炎症薬ジクロフェナク、抗 HIV 薬ネビラピンに絞って、代謝活性化を回避する誘導体の創製を行うことを目的とした。ベンズプロマロンは、尿酸トランスporter阻害剤であり、血中尿酸値を低下させる薬として本邦で広く使われているが、副作用として肝障害や劇症肝炎が発症し死亡者も報告されている。米国では承認されておらず、欧州でも市場から撤退している。代謝活性化機構の詳細は分かっていなかったが、上述の通り申請者らは *ipso* 置換代謝が関与することを初めて明らかにした。一方、ジクロフェナクは代表的な非ステロイド性抗炎症薬として広く使用されているが、シクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害剤特有の胃腸障害のほか、肝障害が問題となっている。現在までにアシルグルクロニドおよびキノニンが反応性代謝物として提唱されている。ネビラピンは、最初の非核酸系 HIV 逆転写酵素 (RT) 阻害剤として市販されて以来、現在でも発展途上国を含め広く使われているが、副作用として高頻度で発症する発疹や、重篤な皮膚毒性 (Stevens-Johnson シンドローム) が問題になっている。また、致死的な肝毒性も報告され、FDA から black box warning の通達がされている。代謝活性化機構としてはキノニン生成が最も疑われているが、肝毒性の原因となる反応性代謝物がキノニンとして確定しているわけではない。以上 3 つの医薬品は、それぞれフェノール、カルボキシ基、芳香族アミン構造を基本骨格に有し、いずれも創薬段階でしばしば用いられる重要な部分構造である一方でリスクのある構造として知られているので、本研究は創薬における代謝活性化機構を回避する一般的な方法論の開発につながることも期待できる。

さらに、本研究を遂行する上で必要となる、反応性代謝物を簡便かつ定量的に検出するための新規蛍光標識トラッピング剤の創製も合わせて行った。

3. 研究の方法

(1) 反応性代謝物検出法の構築

各薬物から生成する反応性代謝物はその高い反応性のために系中の生体成分と共有結合し回収が困難なことが多い。従って、研究を遂行する上で、反応性代謝物を効率的に捕捉できるトラッピング剤が不可欠である。本研究では、まず反応性代謝物を高感度かつ定量的さらに網羅的に捕捉できるように、システインを基盤に蛍光団であるダンシル基を持つ様々な新規蛍光標識トラッピング剤をデザインし合成し、実際のトラッピング試験に適用可能かを評価した。

(2) 誘導体の合成

3 つの医薬品 (ベンズプロマロン、ジクロフェナク、ネビラピン) について、その代謝活性化機構を回避できるようなドラッグデザインを行い、それぞれを適切な合成経路により化学合成した。

(3) 代謝活性化の評価

代謝活性化を評価する方法として、時間依存的な CYP3A4 阻害活性、トラッピング試験、肝細胞を用いた細胞毒性試験、CYP 強制発現細胞を用いた細胞毒性試験、単離ミトコンドリアを用いた毒性試験などを行った。

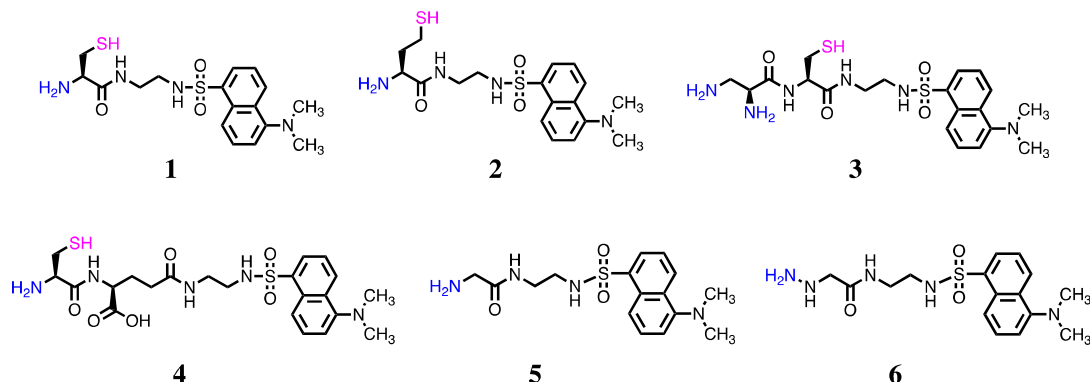
(4) *In vitro* 薬理活性の評価

ベンズプロマロン誘導体については、尿酸トランスporter URAT1 発現細胞を用い、尿酸の細胞取り込みに対する阻害効果を評価した。ジクロフェナク誘導体については、COX-1 及び COX-2 に対する阻害活性を Cayman Chemical COX Fluorescent Inhibitor Screening Kit により測定した。ネビラピン誘導体については、 $[^3\text{H}]$ -dGTP を基質として HIV-RT とともにインキュベーションを行い、DNA 鎖に取り込まれた $[^3\text{H}]$ -dGTP 量を scintillation proximity assay により測定することで、HIV-RT 阻害活性を評価した。

4. 研究成果

(1) 新規蛍光標識トラッピング剤の創製

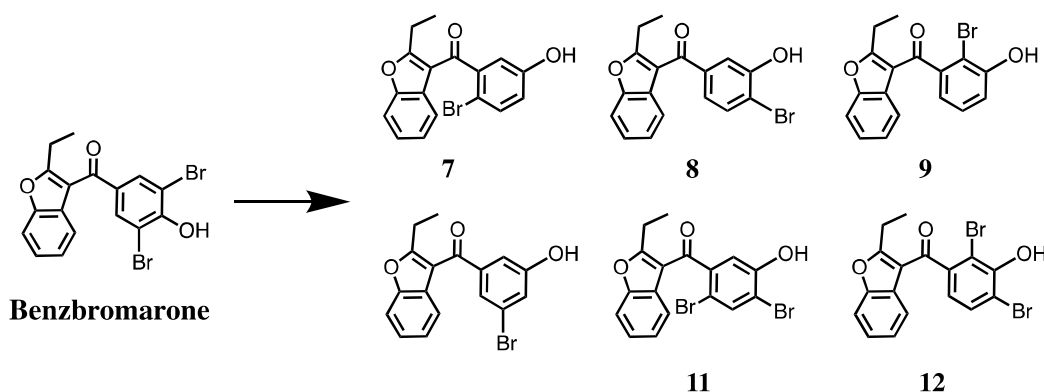
研究に先立って、代謝活性化の程度を効率的かつ定量的に評価する必要があるので、反応性が高い代謝物を系中から安定に捕捉できる新規蛍光標識トラッピング剤の創製を目指し、分子内に蛍光団であるダンシル基を有しソフトおよびハードな求電子性を持つ反応性代謝物を捕捉できる新規トラッピング剤 1-4 を合成し、トラッピング能や CYP に対する阻害効果などの比較検討を行った。その結果、4 は高濃度でも CYP を阻害することなく、ソフトおよびハードな反応性代謝物ともに最も効率的に捕捉できることが示され、新しいタイプのトラッピング剤として有用であることが示された。また、従来、ハードな反応性代謝物を捕捉する蛍光トラッピング剤はなかったが、ハードな反応性代謝物の捕捉に特化したトラッピング剤 5 および 6 も新たに合成した。



新規蛍光標識トラッピング剤

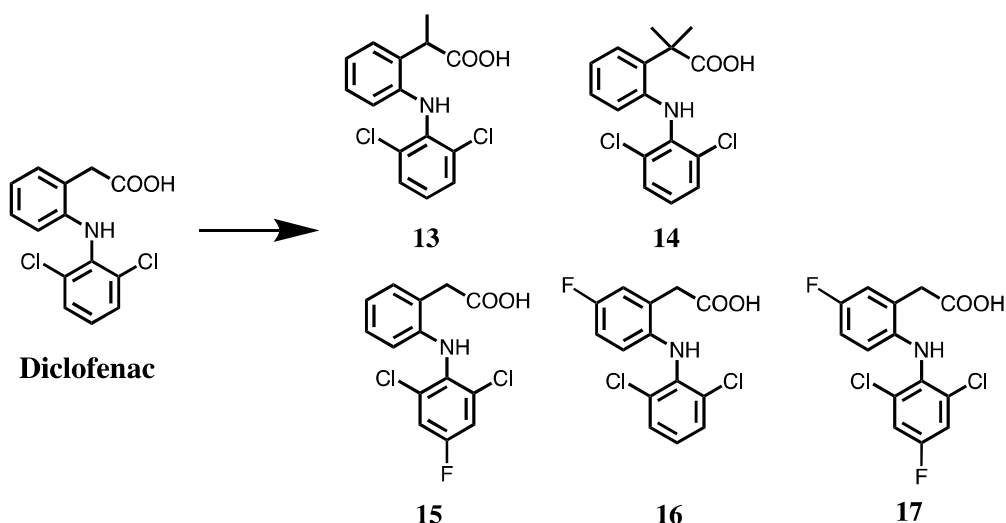
(2) 肝毒性を有する医薬品の代謝活性化を回避した誘導体の創製

我々は、これまでに、高尿酸血症治療薬ベンズプロマロンによる肝毒性が、*ipso*置換代謝反応により生成するジプロモヒドロキノン (*p*-ベンゾキノン) により惹起されることを明らかにしている。本研究では、この *ipso*置換反応機構から活性化を回避できると考えられる 6 種類の誘導体 7-12 をデザイン・合成した。これらの肝細胞毒性を検討した結果、全ての誘導体はベンズプロマロンに比べて毒性が軽減した。また、それらのミトコンドリアに対する毒性を検討した結果、代謝酵素を含む系において誘導体は母化合物ベンズプロマロンよりも低毒性であり、誘導化により期待通り代謝活性化が抑制されたことが示された。次に、尿酸トランスポーター (URAT1) 阻害活性を検討したところ、ベンズプロマロンに比べて阻害能は若干弱くなったものの活性はある程度維持した。以上のように、ベンズプロマロンの毒性を回避した改良型誘導体の創製に成功した。



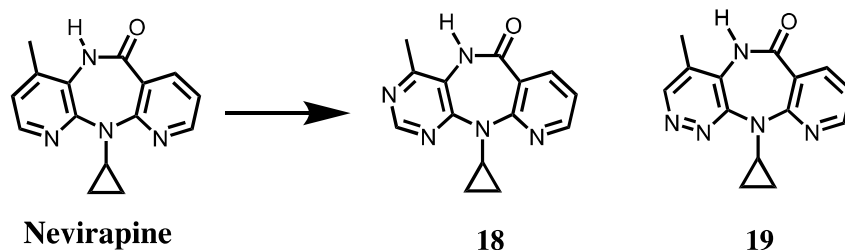
代謝活性化の回避を目指したベンズプロマロン誘導体

同様に、ジクロフェナクの代謝活性化を回避した誘導体創製も行い、まず最初に代謝活性化機構の1つであるカルボン酸のグルクロン酸抱合活性を立体障害で抑えるためにベンジル位にメチル基を導入した 13 および 14 を合成し、そのグルクロン酸抱合活性を検討した。期待通り抱合体の生成量は減少したが、薬効であるシクロオキシゲナーゼ阻害活性は減弱した。一方、もう一つの代謝活性化機構であるキノイミン生成をフッ素導入により抑制した化合物を合成し評価したところ、15 および 17 は薬効を維持した上で、反応性代謝物の生成が抑えられることが示された。以上のようにキノイミン生成の回避はフッ素の導入で可能であることを明らかにしたので、今後の課題として、グルクロン酸抱合代謝物生成の抑制と薬効の維持を両立する新しいデザインに取り組む必要がある。



代謝活性化の回避を目指したジクロフェナク誘導体

さらに、ネビラピンに関して、代謝活性化を回避するためにピリジン環をピリミジン環やピリダジン環に変換した化合物 18 および 19 を合成し、その代謝活性化による CYP3A4 阻害や CYP 依存の細胞毒性が軽減されることが示された。



代謝活性化の回避を目指したネビラピン誘導体

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- 安田大輔, 小畠りか, 高橋恭子, 大江知之, 増野匡彦 (2018) アカデミアにおける Hit-to-Lead の実践 -Keap1-Nrf2 タンパク間相互作用阻害剤の創製-, 薬学雑誌 138, 1359-1365, DOI: 10.1248/yakushi.17-00211-5. (査読なし)
- Ohe, T., Umezawa, R, Kitagawara, Y, Yasuda, D, Takahashi, K, Nakamura, S, Abe, A, Sekine, S, Ito, K, Okunushi, K, Morio, H, Furihata, T, Anzai N, Mashino T. (2018) Synthesis of novel benzobromarone derivatives designed to avoid metabolic activation, Bioorg Med Chem Lett, 28, 3708-3711, DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.10.023. (査読あり)
- 大江知之, 高橋恭子, 中村成夫, 増野匡彦 (2017) ヒトや野生生物における医薬品、環境化学物質の安全性評価の精度向上にむけて -代謝的活性化、種差、エピジェネティクスの観点から 肝毒性を示す医薬品の代謝活性化機構の解析とそれに基づいた創薬戦略, 薬学雑誌 137, 249-255, DOI: 10.1248/yakushi.16-00230-1. (査読なし)
- Yasuda, D., Yuasa, A., Obata, R., Nakajima M., Takahashi, K., Ohe, T., Ichimura, Y., Komatsu, M., Yamamoto, M., Imamura, R., Kojima, H., Okabe, T., Nagano, T., and Mashino, T. (2017) Discovery of benzo[gl]indoles as a novel class of non-covalent Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor, Bioorg Med Chem Lett, 27, 5006-5009, DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.10.008. (査読あり)
- Yasuda, D., Nakajima, M., Yuasa, A., Obata, R., Takahashi, K., Ohe, T., Ichimura, Y., Komatsu, M., Yamamoto, M., Imamura, R., Kojima, H., Okabe, T., Nagano, T., and Mashino, T. (2016) Synthesis of Keap1-phosphorylated p62 and Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitors and their inhibitory activity, Bioorg Med Chem Lett, 26, 5956-5959, DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.10.083. (査読あり)
- Yasuda, D., Takahashi, K., Ohe, T., Nakamura, S., and Mashino, T. (2016) Preparation and antioxidant/pro-oxidant activities of 3-monosubstituted 5-hydroxyoxindole derivatives, J Clin Biochem Nutr, 59, 165-173, DOI: 10.3164/jcfn.16-24. (査読あり)

Saito, T., Ichimura, Y., Taguchi, K., Suzuki, T., Mizushima, T., Takagi, K., Hirose, Y., Nagahashi, M., Iso, T., Fukutomi, T., Ohishi, M., Endo, K., Uemura, T., Nishito, Y., Okuda, S., Obata, M., Kouno, T., Imamura, R., Tada, Y., Obata, R., Yasuda, D., Takahashi, K., Fujimura, T., Pi, J., Lee, M. S., Ueno, T., Ohe, T., Mashino, T., Wakai, T., Kojima, H., Okabe, T., Nagano, T., Motohashi, H., Waguri, S., Soga, T., Yamamoto, M., Tanaka, K., and Komatsu, M. (2016) p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming, Nat Commun 7, 12030, 1-16, DOI: 10.1038/ncomms12030. (査読あり)

〔学会発表〕(計 20 件)

ハード及びソフト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, 柴崎智香子, 高橋恭子, 中村成夫, 大江知之, 増野匡彦, 日本薬学会第 139 年会, 2019.

オキシカム構造を模倣したスルホン類の抗パーキンソン病効果, 小町元輝, 鈴木啓太, 高橋恭子, 中村成夫, 大江知之, 大久保知子, 春名柚佳, 田崎嘉一, 増野匡彦, 日本薬学会第 139 年会, 2019.

ハードな反応性代謝物を捕捉する新規蛍光標識化トラッピング剤の創製, 長邑花, 柴崎智香子, 高橋恭子, 中村成夫, 大江知之, 増野匡彦, 日本薬学会第 139 年会, 2019.

抗パーキンソン病活性を有するテトラロンアナログ B 環へのフッ素の導入と神経細胞保護効果, 伊藤廉, 梅本英明, 三山由美子, 高橋恭子, 中村成夫, 大江知之, 大久保知子, 春名柚佳, 田崎嘉一, 増野匡彦, 日本薬学会第 139 年会, 2019.

フッ素導入により反応性代謝物の生成を回避した改良型 Diclofenac 類縁体の創製, 小川真依, 山田晶子, 安田大輔, 高橋恭子, 中村成夫, 大江知之, 増野匡彦, 日本薬学会第 139 年会, 2019.

p62-Keap1-Nrf2 系を標的とした PPI 阻害剤の肝細胞がん薬剤耐性抑制効果, 安田大輔, 大江知之, 高橋恭子, 小松雅明, 一村義信, 山本雅之, 今村理世, 小島宏建, 岡部隆義, 長野哲雄, 増野匡彦, 第 36 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2018.

Synthesis and biological evaluation of novel nevirapine analogs designed to avoid metabolic activation, Yasuhiro Tateishi, Tomoyuki Ohe, Kyoko Takahashi, Shigeo Nakamura, Tadahiko Mashino, 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX, 2018.

銅触媒を用いた脱フッ素ホウ素化反応を鍵とするアミド医薬品のフルオロアルケンミミック化合物合成とその評価, 丹羽節, 植竹裕太, 磯田紀之, 大江知之, 安田大輔, 増野匡彦, 細谷孝充, 日本ケミカルバイオロジー学会第 13 回年会, 2018.

抗がん剤耐性克服を志向した Keap1-リン酸化 p62 タンパク質間相互作用阻害剤の創薬研究, 安田大輔, 中島真央, 大江知之, 高橋恭子, 小松雅明, 一村義信, 山本雅之, 今村理世, 小島宏建, 岡部隆義, 長野哲雄, 増野匡彦, 第 71 回日本酸化ストレス学会, 2018.

グルクロン酸抱合経路の代謝活性化を回避したジクロフェナク類縁体の創製, 山田晶子, 大江知之, 小川真依, 高橋恭子, 中村成夫, 増野匡彦, 日本薬学会第 138 年会, 2018.

脱フッ素ホウ素化反応を活用したアミド医薬品のフルオロアルケンミミック化合物の合成とその評価, 丹羽節, 植竹裕太, 磯田紀之, 大江知之, 安田大輔, 増野匡彦, 細谷孝充, 日本薬学会第 138 年会, 2018.

医薬品としての物性向上を目指した Keap1-リン酸化 p62 結合阻害剤の創製, 中島真央, 安田大輔, 大江知之, 高橋恭子, 小松雅明, 一村義信, 今村理世, 小島宏建, 岡部隆義, 長野哲雄, 増野匡彦, 日本薬学会第 138 年会, 2018.

Strategic Drug Design to Eliminate Metabolic Activation of Hapatotoxic Drugs, 大江知之, 日本薬物動態学会第 32 回年会, 2017 (シンポジウム).

ADMET 研究と創薬化学を融合した新しいアカデミア創薬, 大江知之, 第 61 回日本薬学会関東支部大会, 2017 (シンポジウム).

代謝活性化を回避した新規ベンズプロマロン類縁体の合成およびその毒性評価, 梅沢隆太郎, 北川原弓奈, 高橋恭子, 中村成夫, 阿部晃子, 関根秀一, 伊藤晃成, 大江知之, 増野匡彦, 第 61 回日本薬学会関東支部大会, 2017.

ネビラピン A 環及び B 環の変換により代謝活性化を回避した新規誘導体の合成, 立石泰寛, 藤澤真太郎, 高橋恭子, 中村成夫, 大江知之, 増野匡彦, 日本薬学会第 137 年会, 2016.

ナフタレン骨格を有する選択的 Keap1-リン酸化 p62 阻害剤の創製研究, 中島真央, 安田大輔, 吉田超人, 大江知之, 小畠りか, 高橋恭子, 小松雅明, 一村義信, 山本雅之, 今村理世, 小島宏建, 岡部隆義, 長野哲雄, 増野匡彦, 第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2016.

新規非共有結合性 Keap1-Nrf2 結合阻害剤の探索と誘導体合成, 安田大輔, 大江知之, 湯浅章弘, 小畠りか, 高橋恭子, 小松雅明, 一村義信, 山本雅之, 今村理世, 小島宏建, 岡部隆義, 長野哲雄, 増野匡彦, 日本ケミカルバイオロジー学会第 11 回年会, 2016.

酸化ストレス応答性新規 Keap1-Nrf2 結合阻害剤の創製, 湯浅章弘, 安田大輔, 大江知之, 湯浅章弘, 小畠りか, 高橋恭子, 小松雅明, 一村義信, 山本雅之, 今村理世, 小島宏建, 岡部隆義, 長野哲雄, 増野匡彦, 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2016.

Discovery and preparation of novel inhibitors for Nrf2-Keap1 and p62-Keap1 protein-protein interaction, for Nrf2 activator and suppressor, Daisuke Yasuda, Akihiro Yuasa, Mao Nakajima, Taketo Yoshida, Rika Obata, Tomoyuki Ohe, Masaaki Komatsu, Yoshinobu Ichimura, Masayuki Yamamoto, Riyo Imamura, Hirotatsu Kojima, Takayoshi Okabe, Tetsuo Nagano, Tadahiko Mashino, The 23rd Annual Meeting, a joint meeting with the Society for Free Radical Research International, San Francisco, CA, 2016.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：パーキンソン病治療薬

発明者：増野匡彦，大江知之，高橋恭子，安田大輔，田崎嘉一

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2019-014281

出願年：2019年

国内外の別：国内

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。