

令和元年5月22日現在

機関番号：32525

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15519

研究課題名(和文)カルボキシルエステラーゼの基質特異性を考慮した臓器選択的プロドラッグの分子設計

研究課題名(英文)Molecular design of organ-specific prodrugs considering substrate specificity of carboxylesterases

研究代表者

高橋 正人(Takahashi, Masato)

千葉科学大学・薬学部・助教

研究者番号：40738770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エステル型及びアミド型プロドラッグの代謝活性化に重要な役割を果たしているヒトカルボキシルエステラーゼの基質特異性を解明した後、基質特異性と臓器分布を利用し、特定の臓器で代謝活性化されるプロドラッグモデルの設計及び合成を行うことを目的とした。エステル近傍のアルコキシ基の立体障害や電子密度を調節することで、ヒト肝臓ミクロソーム中で選択的に代謝活性化されるインドメタシンプロドラッグを合成した。また、アシル基の立体障害を調節することで、作用持続型のハロペリドールプロドラッグを合成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医薬品シーズの中には、十分な薬理活性があるものの、体内動態(吸収・分布・代謝・排泄)において良好な結果が得られず、開発を断念したものが数多く存在する。本研究では、薬物の代謝において主要な役割を果たしている加水分解酵素の性質を解明し、医薬品の構造と代謝速度の関係を明らかにした。さらに、本研究で得られた加水分解酵素の性質を応用し、特定の臓器で特異的に代謝活性化するプロドラッグや作用持続型のプロドラッグの設計及び合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this project, after clarifying the substrate specificity of human carboxylesterase, which plays an important role in the metabolic activation of ester- and amide-type prodrugs, we design and synthesize prodrugs that are metabolically activated in specific organs. By controlling the steric hindrance and the electron density of the alkoxy group near the ester, we synthesized an indomethacin prodrug that is selectively metabolically activated in human liver microsomes. In addition, by controlling the steric hindrance of the acyl group, a long acting haloperidol prodrug was synthesized.

研究分野：薬物代謝学

キーワード：プロドラッグ 加水分解酵素 生体機能利用 薬学 有機化学

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

1. 研究開始当初の背景

プロドラッグが体内で効率的に代謝活性化されるためには、その化学構造を標的臓器に発現している代謝酵素と親和性が高いものにする必要がある。市販のエステル型プロドラッグにおいて、その多くはカルボキシルエステラーゼ (CES) によって代謝活性化されることが確認されているが、本酵素の基質特異性や種差に関しては未解明な部分が多い。これまでに当研究室では CES に関する研究の一環として、市販の医薬品や天然物の CES 代謝活性の評価を行っており、ヒトにおいて肝臓で主に発現している CES1 は、エステルにおけるアルコキシ基側が小さい基質を、小腸で主に発現している CES2 は、アシル基側が小さい基質をそれぞれ効率的に加水分解することを見出している。これまでの報告では、エステル、アミド基質の全体的な長さや大きさ等の立体的要因に関しては調査されてきたが、電子密度やヘテロ原子の存在等による電子的要因に関しては調査が十分ではなかった。

CES はエステル、アミドやチオエステル結合を効率良く加水分解することから、医薬品のみならず多くの天然物、食品、環境化学物質等の代謝や解毒に関与している。本酵素の加水分解活性は、エステルの大きさによって変動することが証明されているが、それ以外の要因に関しては調べられていない。エステルの大きさはほぼ同じであるが、活性が大きく変化する例も存在しており、電子的要因についても解明する必要があると考えられる。本研究では、基質を化学合成することで、より詳細に CES の基質特異性を明らかにすることができる。その結果、数多くのエステル、アミド、チオエステルを含有する様々な化合物の代謝に関する新しい知見を得ることができる。

2. 研究の目的

本研究では、インドメタシンとハロペリドールを対象として、エステル、アミド及びチオエステル体を網羅的に化学合成し、ヒトにおける主要なアイソザイム CES1 及び CES2 の加水分解活性を評価することで、CES の基質特異性を解明することを目的とした。さらに、得られた情報と CES の臓器分布を利用し、肝臓や小腸などの特定の臓器で選択的に代謝活性化するプロドラッグの開発を試みた。

3. 研究の方法

本研究はプロドラッグモデルの合成、加水分解活性の評価により構成される。まず、立体的及び構造的に異なるプロドラッグモデルを網羅的に合成した後、各 CES 発現系を用いて加水分解試験を行い、HPLC にて代謝活性化体であるインドメタシンまたはハロペリドールの定量分析を行った。その結果をもとに、CES1 と CES2 の加水分解活性が大きく異なるエステル構造を見つけ出し、再度類似の構造のエステル体を設計し、合成と評価を繰り返し行った。本研究では、(1) 種々のエステル化体の合成法を検討、(2) 合成した基質の肝ミクロソーム、小腸ミクロソームおよび CES 溶液中での代謝活性化速度の調査について、詳細な実験を行った。

まず、(1) において、インドメタシンについては、縮合剤として DCC または EDC を DMAP 存在下で各種アルコールと反応させることでインドメタシンエステルを得た (図 1)。ハロペリドールについては、各種酸無水物と反応させることでハロペリドールエステルを得た (図 2)。ピバル酸エステルについては、酸塩化物を用いることで合成し、同時に得られたエノールピバル酸エステルについても加水分解試験を行うこととした (図 3)。

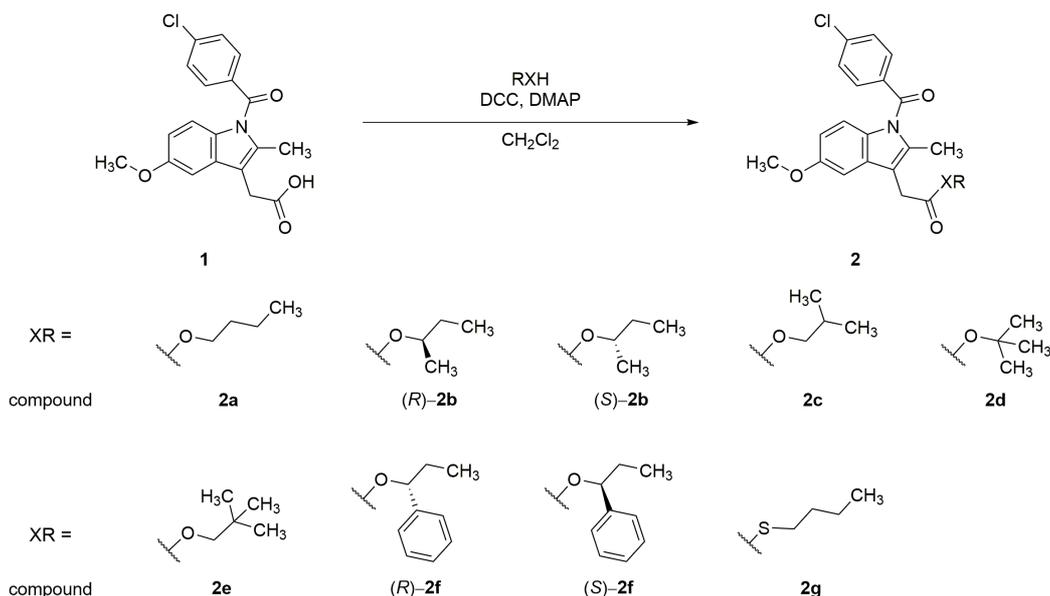


図 1. インドメタシンエステルの合成

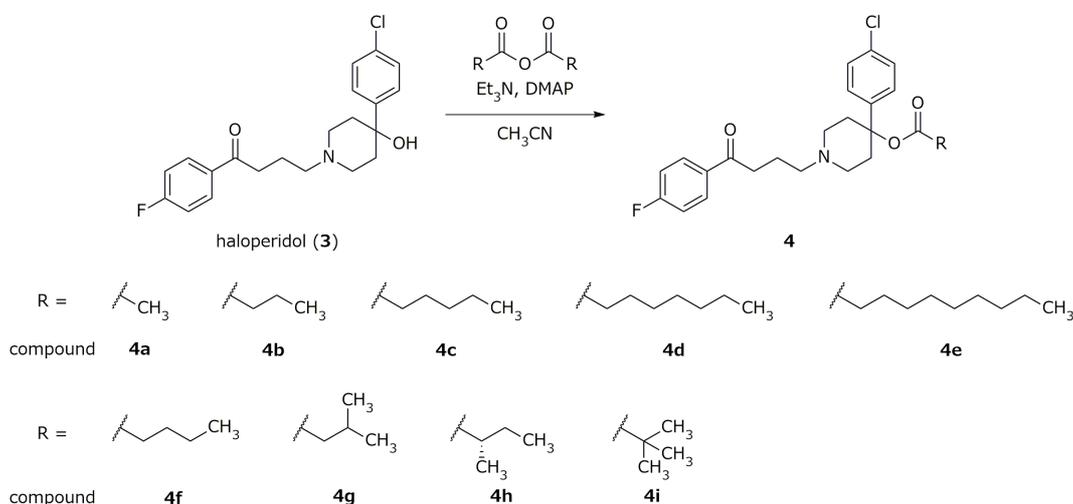


図 2. ハロペリドールアルコールエステルの合成

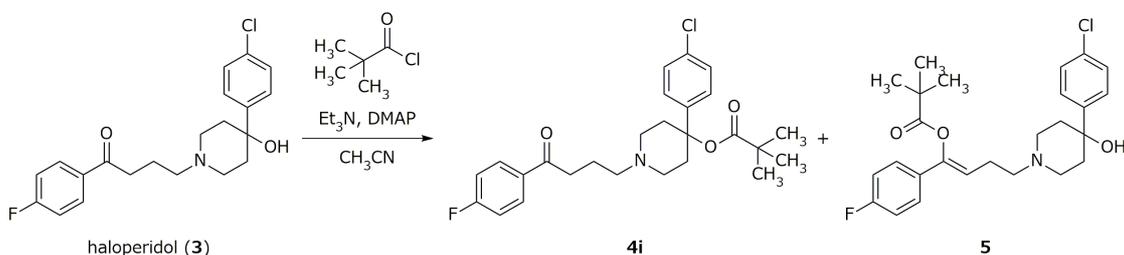


図 3. ハロペリドールエノールエステルの合成

次に、(2) において、各濃度に希釈したプロドラッグ溶液、100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 及び 0.025 mg/mL 酵素溶液の混合液を 37 度で 30 分、180 分または 24 時間反応させた。その後、内標準物質溶液を添加し、遠心後の上清をろ過した後、得られたる液を HPLC により分析し、代謝活性体の定量を行った。この反応速度と置換基の関係について、分子の大きさ、アシル部位及びアルコール部位の大きさ、エステル電子密度という 3 つの観点から考察することで、CES に親和性の高い構造を見付け出した。

4. 研究成果

(1) インドメタシンエステル

合成したインドメタシンエステルを hCES1 溶液中で反応させ、加水分解パラメータを得た (表 1)。直鎖アルキル基を有する 2a において最も加水分解速度が高くなり、エステル近傍の立体障害が大きい 2b, 2d, 2f では加水分解速度が小さくなった。また、加水分解速度が小さいものほど K_m 値が大きくなった。エステル近傍の立体が小さい方が酵素との親和性が高くなり加水分解速度は大きくなるが、エステル近傍の立体が大きくなるにつれて加水分解速度は小さくなると考えられる。この結果を利用し、立体障害を調節することで代謝活性化速度をコントロールすることができる可能性が示唆された。次に、チオエステル 2g の V_{max} 値は 2a の値よりも低かったものの、 CL_{int} の値は 2g の方が高かった。2b と 2f については、立体異性体をそれぞれ調査したところ、立体異性体間で加水分解速度が大きく異なる結果となった。この結果より、エステル型医薬品の代謝速度はエナンチオマー間で大きく異なる可能性があり、特にベンジルアルコール型のアルコキシ基を持つエステルには注意が必要であることが示された。

次に、合成したインドメタシンエステルをヒト肝ミクロソーム溶液と小腸ミクロソーム溶液で代謝活性化試験を行ったところ、2a や 2e が選択的に肝ミクロソーム溶液中で代謝活性化されることがわかった。この結果より、アルコキシ基の立体障害は比較的小さいものの方が肝臓中で選択的に代謝活性化される可能性が高いことがわかった。

表 1. CES1 溶液中におけるインドメタシンエステル加水分解パラメータ

compound	V _{max} (nmol/mg protein/min)	K _m (mM)	CL _{int} (mL/mg protein/min)
2a	1.512±0.041	4.4±0.4	0.34
(R)- 2b	0.049±0.003	10.1±2.1	0.0048
(S)- 2b	0.103±0.009	48.5±10.3	0.0021
2c	1.221±0.082	13.7±2.9	0.089
2d	nd	nd	nd
2e	0.322±0.014	4.6±0.7	0.069
(R)- 2f	0.021±0.001	2.9±0.4	0.007
(S)- 2f	0.002±0.0001	6.5±1.1	0.0003
2g	0.800±0.016	2.1±0.3	0.38

(2) ハロペリドールエステル

合成したハロペリドールエステルを hCES1 溶液または hCES2 溶液中で反応させ、加水分解パラメータを得た (表 2,3)。まず、ハロペリドールアルコールエステル (**2a-2i**) は主に CES2 によって代謝活性化され、同ハロペリドールエノールエステルは CES1 によって代謝活性化されることが明らかとなった。CES2 による加水分解反応は、アシル基の大きさに依存するため、立体障害の小さい酢酸エステル **2a** の加水分解速度が最も高くなると予想されたが、予想に反してヘキサン酸エステル **2c** の加水分解速度が高くなり、**2c** の炭素数から離れるにつれて加水分解速度は小さくなった。よって、CES2 による加水分解反応においては、ヘキサン酸エステルから構造を少しずつ変えることによって代謝活性化速度を低下させ、作用時間を調節することができる可能性を見出した。

表 2. CES2 溶液中におけるハロペリドールエステルの加水分解パラメータ

Compound	V _{max} (nmol/mg protein/min)	K _m (μM)	CL _{int} (mL/mg protein/min)
4a	23.0±4.80	1730±979	0.0133
4b	22.4±1.76	261±103	0.0858
4c	29.8±1.66	25.6±3.68	1.16
4d	23.4±1.85	53.4±8.58	0.438
4e	11.2±1.42	52.6±13.0	0.213
4f	27.0±3.32	36.4±10.3	0.742
4g	nd	nd	nd
4h	2.27±0.276	25.5±8.16	0.0889
4i	nd	nd	nd
5	2.97±0.557	4.21±3.59	0.705

表 3. CES1 溶液中におけるハロペリドールエステルの加水分解パラメータ

Compound	V _{max} (nmol/mg protein/min)	K _m (μM)	CL _{int} (mL/mg protein/min)
4f	nd	nd	nd
4g	nd	nd	nd
4h	nd	nd	nd
4i	nd	nd	nd
3	16.8±0.679	5.87±0.960	10.9

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (査読有) Takahashi, M.; Uehara, T.; Nonaka, M.; Minagawa, Y.; Yamazaki, Y.; Haba, M.; Hosokawa, M., Synthesis and evaluation of haloperidol ester prodrugs metabolically activated by human carboxylesterase, *Euro. J. Pharm. Sci.*, **132**, 125-131 (2019).
- (査読有) Takahashi, M.; Ogawa, T.; Kashiwagi, H.; Fukushima, F.; Yoshitsugu, M.; Haba, M.; Hosokawa, M., Chemical synthesis of an indomethacin ester prodrug and its

metabolic activation by human carboxylesterase 1, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 28, 997-1000 (2018).

[学会発表](計 6 件)

1. 廣田伊吹, 中野智之, 高橋正人, 巾正美, 細川正清, カルボキシルエステラーゼ 1 による代謝活性化におけるインドメタシンプロドラッグの立体のおよび電子的影響, 日本薬学会第 139 年会, 千葉, 2019.
2. 高荷大輔, 高橋正人, 巾正美, 細川正清, ヒトカルボキシルエステラーゼ 1 のキラリ認識能の解明: インドメタシンエステルの光学分割への応用, 日本薬学会第 139 年会, 千葉, 2019.
3. Takahashi, M., Ogawa, T., Kashiwagi, H., Fukushima, F., Yoshitsugu, M., Haba, M., Hosokawa, M., Chemical synthesis of an indomethacin prodrug and its metabolic activation by human carboxylesterase 1, International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX. Kanazawa, 2018.
4. 堺早知子, 溝井健太, 高橋正人, 巾正美, 宇野泰広, 今井輝子, 細川正清, 様々な構造および電子的特徴を持つアトルバスタチンエステルを用いたマウス、カニクイザルおよびヒトカルボキシルエステラーゼ活性の種差, 日本薬学会第 138 年会, 金沢, 2018.
5. 高橋正人, 小川悌央, 柏木裕史, 福島史也, 吉次美咲, 巾正美, 細川正清: インドメタシンプロドラッグの合成とカルボキシル エステラーゼ 1 による代謝活性化. 日本薬学会第 138 年会要旨集, 金沢, 2018.
6. 堺早知子, 溝井健太, 高橋正人, 巾正美, 宇野泰広, 今井輝子, 細川正清, Species differences of mouse, cynomolgus monkey and human carboxylesterase using atorvastatin esters with various steric and electronic properties, 日本薬物動態学会第 32 回年会, 東京, 2017.