

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670008

研究課題名(和文) 生体模倣カクテル試薬を用いた『薬物の潜在的リスク評価システム』の開発

研究課題名(英文) Development of biomimetic cocktail reagent to screen potential risks of drugs

研究代表者

大江 知行 (Oe, Tomoyuki)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10203712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：【背景・目的】薬物の反応性代謝物は、生体高分子との共有結合を介し副作用を惹起するため、通常グルタチオン等のトラッピング試薬とLC-MSの組合せでスクリーニングされる。そこで本法の「スループットの低さ」、「生体高分子との差異」、「試薬自身の代謝」等の問題点を改善すべく、ハイスループット・ハイブリッドな評価システム開発を目的にした。【成果】 求核性部位の単純モチーフ化とカクテルとしての利用により、反応点の網羅と代謝の問題を解決した。各試薬の安定同位体標識体の添加で、特徴的なダブルレットピークによる生成物の評価が出来た。ダブルレットピークをトリガーとする自動MS/MS解析法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Background・Aim: Reactive metabolites of drugs result in adverse drug reactions through the formation of covalent binding to biological macromolecules. Therefore, trapping assays, such as glutathione trapping method, are widely performed together with LC-MS for the screening. However, the current strategy still has problems: ex. low throughput, structural gap between trapping reagents and biological macromolecules, and metabolic degradation of the reagents. We therefore aimed to develop a high-throughput/hybrid screening system to solve the problems. Outcome: I) Using simple motif of each nucleophilic site followed by mixing as a cocktail, the structural gap and metabolic degradation were avoided. II) Concomitant use of the stable isotope labeled motifs facilitated the screening because of the characteristic doublet peaks. III) Isotope pattern dependent scanning enabled the automated MS/MS analysis using the characteristic doublet peaks.

研究分野：臨床分析化学

キーワード：反応性代謝物 トラッピング試薬 カクテル試薬

1. 研究開始当初の背景

背景(1)『代謝物に起因する毒性』: 薬物の反応性代謝物は、生体高分子と共有結合を生成する。その結果:

- 抗原性獲得によるアレルギー
 - CYP 阻害を含む肝障害
 - DNA との反応による遺伝毒性
- 等の重篤な副作用を惹起し得る。しかし、薬物代謝の個人差等により予測が困難故、開発後期あるいは上市後、見つかることも多く、医薬品開発・臨床の場で最も憂慮されるリスクのひとつである。

背景(2)『既存のリスク評価法(国内外の他研究者の研究概要)』: 不安定な反応性代謝物の直接分析・反応性評価は困難であり、以下の手法が汎用されている

- トラッピング試薬と LC-MS* の組合せ: グルタチオン、シアン化物イオン、合成ペプチド、DNA などの求核性トラッピング試薬の利用
- タンパク質との付加体そのものを検出する方法: プロテオミクスの手法による CYP3A4、血清アルブミン付加体の分析

背景(3)『既存の方法の問題点』: 前者では反応点をカバーしていない・スループットの低さ・トラッピング試薬自身の代謝、後者ではモデル実験の域を超えない、などの問題がある。

背景(4)『申請者の研究成果、着想に至った経緯』: 申請者は、現在まで求電子性化合物によるタンパク質・DNA の『化学修飾』、『スクリーニング』を研究する中で、質量分析と安定同位元素標識を組合せたアプローチで『毒性発現メカニズムまで言及できるハイスループットリスク評価システム』を創成し得るとの着想に至った。

2. 研究の目的

- 薬物は代謝過程で、想定外の反応性代謝物を与える。
- これらはタンパク質・DNA と共有結合し、重篤な副作用を惹起し得る。
- この様な『潜在的副作用』は予測困難であり、満足できるリスク予測システムは無い。

そこで申請者は、臨床・創薬研究の著しい加速・進展に貢献すべく、以下の目的で研究を推進する。

- 従来法の欠点を全てクリアし得る、新規リスク予測システムを開発する
- 反応性のみならず、毒性発現メカニズムまで言及できるシステムとする
- ハイスループット・自動化可能なシステムとする

3. 研究の方法

(1)新規トラッピングカクテルのデザインと調製

求核性アミノ酸側鎖およびDNAをモチーフとする単純な化合物を数種選択(デザ

イン)し、購入(調製)した。上記化合物の安定同位元素標識体を購入(調製)した。この時、アミノ酸残基ごとに標識数を変えた物とした。可能な場合標識は、同位体効果の少ない¹³Cおよび¹⁵N、導入の容易な2H(D)を用いた。Cys型モチーフの-SH基のジスルフィドへの空気酸化を避ける保存条件を検討した(EDTAの添加、酸性条件など)。重水素(D)標識の物は、保存中・反応条件での標識の脱離など、安定性を検討した。

これら全てを混合(非標識体:標識体=1:1)したカクテルを調製した。
例)Arg型(1-methylguanidine; D₀/D₃), Cys型(2-mercaptoethanol; D₀/D₄), His型(4-methylimidazole; D₀/D₅), Lys型(n-butylamine; D₀/D₆), DNA塩基型(2'-deoxyguanosine; ¹⁵N₀/¹⁵N₅) (市販されていない物は、調製した)。

(2)個々の試薬の評価(反応性・安定性)

求電子性構造別に薬物の反応性代謝物数種をモデルとして購入あるいは調製した。

例)第I相代謝物:エポキシ体(carbamazepine-10,11-epoxide)、不飽和カルボニル(2-oxoticlopidine)、キノン類縁体(N-acetyl-p-benzoquinone imine)、ニトロソ体(4-nitroso sulfamethoxazole)など。

例)第II相代謝物:エステル型グルクロナイド(diclofenac acyl glucuronide)など。

(1)の求核性アミノ酸・DNAモチーフとの反応性を生理的条件化(pH7.4)精査した。

- 個々の成績体の化学構造を確認した。
- 反応中~反応後の生成物中の安定同位元素標識の脱離など、安定性を検討した。

(3)検出系の評価

反応部位を迅速に評価すべくArg型(3 Da), Cys型(4 Da), His型(5 Da), Lys型(9 Da), DNA塩基型(5 Da)で見られるダブレットピークを測定した。また、DNA塩基型(5 Da)はPSD/MS2によりHis型(5 Da)と区別した。自動化を考慮した構造情報獲得のためFIA-ESI-MS/MS(イオントラップ型)も検討した。アイソトープパターンを認識した、isotope pattern dependent MS/MSを設定した。

(4)前処理の検討

従来のグルタチオントラッピングと異

なり、生成物は疎水性かつ安定な物と推測される。
固相抽出カートリッジ(C18等)を用い、洗浄条件・溶出条件を最適化し、回収率等を検討した。

(5) in vitro 代謝系での応用

肝ミクロソームを用いた in vitro 代謝系とモデル薬物(2)で反応性を確認した benzodiazepine, carbamazepine, diclofenac など)を検討した。
(2)で用いた活性化体標品と同様の付加体が得られるか確認した。
肝ホモジネートで評価可能か検討した。

4. 研究成果

- (1) 各プローブは、保存ならびにインキュベート中、安定であった。
- (2) 3種のイオン化法を比較し、測定対象の相違に寛容かつ高流速での使用が可能なAPCIを選択した。
- (3) 最適化したLC条件で1サンプル1.8分の測定が可能であった。
- (4) 本法で捕捉したモデル化合物は、ダブルピークの質量差により、容易に反応点を同定可能であった。
- (5) 標識体との質量差が同じArgとDNA型プローブ(3 Da)の付加体は、デオキシリボースのインソース脱離(ISD)X-116 Da)の有無で分別できた。
- (6) グルタチオンで捕捉困難なアルデヒド(PLP, 4-DCA)は、Lys型プローブ付加体として検出できた。
- (7) 本法により、ラット肝ミクロソーム懸濁液中、NADPH存在下、インキュベートしアセトアミノフェン、プラノロール代謝物由来のCys型プローブ($[^2\text{H}_6]/[^2\text{H}_4]$ -2-mercaptoethanol混液)付加体がダブルピーク(4 Da)として検出された。
- (8) IDDSを用いることで、KP-Lys型プローブ付加体のダブルピーク(9 Da)をトリガーにしたMS/MS自動解析が可能であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1件)

Fumio OSAKI, Takaaki GOTO, Seon Hwa LEE, Tomoyuki OE: Predicted multiple selected reaction monitoring to screen activated drug-mediated modifications on human serum albumin. Analytical Biochemistry, 449 (2014), 59-67. DOI: 10.1016/j.ab.2013.12.016 (査読有り).

[学会発表](計 6件)

大江知行: 生体高分子の化学修飾解析: バイオマーカー研究と毒性学研究の接点、第42回日本毒性学会学術年会、2015年6月29日~7月1日、金沢市(招待講演)

大江知行: アミノ酸の修飾解析を通じたバイオマーカー研究、新アミノ酸分析研究会第4回学術講演会、2014年11月17日、東京(招待講演)

大江知行: 分子カルテ: タンパク質を生体内イベントの記録媒体と考える化学修飾解析、日本食品科学工学会第61回大会、2014年8月28~30日、福岡市(招待講演)

大江知行: タンパク質を精密分析してわかる事、第31回無機・分析化学コロキウム、2014年5月30~31日、大崎市(招待講演)

大江知行: 質量分析だから出来る薬物動態研究とバイオマーカー探索~演者の研究例から~、第61回質量分析総合討論会、2013年9月10日~12日、つくば市(依頼講演)

大江知行: 質量分析によるタンパク質・ペプチドの精密定量分析、日本臨床化学会・日本臨床検査学会東北支部シンポジウム、2013年7月20日、仙台市(依頼講演)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~bunseki/bunseki.html>

6. 研究組織
(1)研究代表者

大江 知行 (OE, Tomoyuki)
東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：10203712

(2)研究分担者

後藤 貴章 (GOTO, Takaaki)
東北大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号：40344684

李 宣和 (LEE, Seon Hwa)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：60519776

(3)連携研究者

()

研究者番号：