

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2014

課題番号：23136102

研究課題名（和文）小分子 - 生体システム相互作用の分子階層における統合的解析

研究課題名（英文）Integrated analysis of biological interaction of small molecules at the molecular level of living organisms

研究代表者

山下 富義（Yamashita, Fumiyoshi）

京都大学・薬学研究科（研究院）・准教授

研究者番号：30243041

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 31,500,000 円

研究成果の概要（和文）：小分子の体内挙動は階層構造を持った生体システムとの物理的な相互作用の総体であり、その最も最下層で起こるイベントが分子間相互作用である。本研究ではまず、薬物小分子と薬物動態関連タンパク質との相互作用に関する網羅的な情報収集および構造活性相関解析の方法を確立した。さらに、酵素誘導を伴う薬物間相互作用の予測研究を中心に、薬物小分子が分子階層での相互作用から全身動態に及ぼす影響を予測する方法を開発し、汎用生体機能モデリング・シミュレーションプラットフォーム上で生体現象の再現に成功した。

研究成果の概要（英文）：A disposition behavior of small molecules is integration of their interactions with biological organisms comprising of multi layers. in which the lowest events are molecular interactions. In this study, we established methods for systematically collecting information on interaction between small molecule drugs and ADME-related functional proteins and for analyzing their structure-activity relationship. Being exemplified by the prediction of enzyme induction-associated drug-drug interaction, a method for predicting effect of small molecule drugs on pharmacokinetics of other or its own molecules was also developed. We succeeded in reproducing the biological phenomena on an open platform for multi-level modeling and simulation of physiological system.

研究分野：薬物動態学

キーワード：生体生命情報学 薬物動態 構造活性相関 薬剤反応性 酵素誘導 生理学的モデル

1. 研究開始当初の背景

近年、薬物分子をはじめとする小分子の生体内代謝や輸送に關与する多くの分子実体がクロニングされ、それらの機能解析が活発に進むとともに、これらの発現を調節する生体分子ネットワークも明らかになりつつある。基本的には、これらの情報伝達・転写制御ネットワークと代謝や輸送に關与する分子がクロストークすることで小分子の生体内挙動の恒常性が維持されているが、例えば薬物代謝酵素の誘導による薬物のクリアランス変動に代表されるように、制御ネットワークに作用する小分子の働きにより他の小分子の動態が大きく変動することも数多く報告されている。しかしながら、こうした小分子生体内挙動の変動に対して、ネットワークレベルでの定量的な解釈はほとんど得られていない。現在、世界各国では、これらの制御ネットワーク内の各分子に対して化合物との相互作用を評価するスクリーニング系の確立が競って行われ、小分子と生体分子との相互作用に關する情報が収集されるようになってきている。

2. 研究の目的

本研究は、薬物小分子の生体内挙動に關し、主として分子階層における挙動すなわち小分子と生体分子との相互作用の解明に焦点を絞って実施する。小分子の生体内挙動に關与する代謝酵素・輸送タンパク質、およびこれらの発現調節に關わる受容体等に対して、薬物や内因性小分子との相互作用に關する情報を網羅的に収集し、ケモインフォマティクス解析手法を駆使して小分子 - タンパク質間相互作用を統合的な解析し、分子階層における数理モデル化を目指す。さらに、上位階層（細胞・組織・臓器）における小分子動態パラメーター（濃度やキネティクスパラメーターなど）とのシームレスな連結を目的として各レイヤー間の関連解析を行い、小分子の分子情報から多階層生体システムにおける生体内挙動をシミュレーションする道を開拓する。これに対する具体的な課題として、薬物代謝酵素の誘導およびそれに伴う酵素誘導を中心に取り上げて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) タンパク質と化合物との相互作用に關するテキストマイニングシステムの構築：まず米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI) が提供する MeSH Term を解析し、化合物名およびタンパク質名をリストした辞書データベースを構築した。タグ作成、形態素解析および構文解析には、自然言語処理オープンソフトウェア GATE の基

本コンポーネントを利用することとしたが、文脈に基づくセマンティック解析のためのルールベースは JAPE 言語を使って作成し、GATE に実装した。基本的には、文を名詞句と動詞句に分け、名詞句に含まれるタンパク質名および化合物名を、動詞句から動詞を抽出し、それらの語順と動詞の時制および意味から相互作用の分類を行なった。また、動詞性名詞に關しても解析対象に含めることで、再現率の向上を図った。

(2) 核内受容体 Pregnane X receptor (PXR) とリガンドとの相互作用に關する構造活性相関解析：収集されたデータを訓練用とテスト用に分割し、訓練用データに対して再帰分割解析を行った。まず化合物の分子構造に基づき、ADMET Predictor 5.0 (Simulation Plus 社) を用いて化合物の分子記述子 (構成記述子、トポロジー記述子、電荷記述子、疎水性記述子、水素結合能、イオン化率) を算出した。PXR の作動薬と非作動薬を識別する決定木の分類ルールは、Gini 多様性指標を基準に Greedy 法により決定した。この再帰分割解析は MATLAB Statistical Toolbox の treefit 関数を用いて行い、treeprune 関数を併用して枝刈りした決定木を最終解とした。

(3) CYP3A4 誘導を介した薬物間相互作用のシミュレーション解析：代表的な CYP3A4 誘導剤である rifampicin をモデル薬物として臨床薬物動態データの解析を行った。データ解析にあたっては、肝臓への血流のみを考慮した生理学的速度論 (PBPK) モデルを構築した。なお、酵素誘導が起る際の薬物の固有クリアランスは、

$$CL_{int,h}^{induction} = CL_{int,h}^0 (f_{m_{CYP3A4}} \cdot CYP + (1 - f_{m_{CYP3A4}}))$$

で表され、 $f_{m_{CYP3A4}}$ 、 $CL_{int,h}^0$ 、 CYP はそれぞれ、肝消失に対する CYP3A4 代謝の寄与率、誘導剤非存在下での肝固有クリアランス、誘導剤存在下による CYP3A4 誘導率を表す。 CYP は刺激によって変動する時間依存的な変数である。

一方、rifampicin による CYP3A4 遺伝子の転写・翻訳の活性化は、

$$\frac{dPXR_{act}}{dt} = \frac{1 + CYP_0/K_i}{1 + CYP/K_i} \frac{RIF}{EC_{50} + RIF} - k_{inact} PXR$$

$$\frac{dRNA}{dt} = k_{rna} + k_{ma,pxr} PXR - k_{rna,deg} RNA$$

$$\frac{dCYP}{dt} = k_{ma} RNA - k_{cyp,deg} CYP$$

で表される。ここでは、rifampicin が PXR を活性化し、RNA の転写が促進されると仮定する。なお、 $CYP' = CYP/CYP_0$ である。 CYP_0 は無刺激下での CYP3A4 の定常状態発現量であり、rifampicin による刺激の消失とともに定常レベルに戻ると仮定した。初代ヒト肝細胞では著しいロット間変動が知られてお

り、in vitro 実験データの解析においてはロット間において CYP_0 が異なると仮定した。

4. 研究成果

(1) P-gp 基質に関するテキストマイニング：P-glycoprotein (P-gp) は代表的な薬物排出トランスポーターであり、小腸での薬物吸収や血液脳関門での輸送の制限、肝臓での胆汁排泄に参与する。本研究では、P-gp と相互作用する化合物に関して網羅的に情報収集するために自然言語処理によるテキストマイニングを行った。まず、相互作用様式を特定するために、基質、誘導剤、阻害剤に關係する動詞(動詞性名詞を含む)を精査した。1976年から2013年までのP-gpに関する2万件強のPubMed要旨を解析したところ、基質、誘導剤、阻害剤に関してそれぞれ約3200、670、2900のレコードが得られた。200件の要旨に対して評価を行ったところ、化合物の抽出に対して recall 90%、precision 84%、相互作用様式の抽出に対して recall 72%、precision 79%と、開発したシステムが高い性能を有することが確認された。得られたレコードを精査し、最終的には基質334個、誘導剤104個、阻害剤310個が得られ、比類ない情報収集に成功した。

P-gp 基質は、チトクロム P450 (CYP) 分子種 CYP3A4 の基質にもなりやすいことが指摘されてきた。その妥当性の検証を目的として、同様にテキストマイニングで収集した CYP 分子種の基質データとの相同性を検討した。CYP3A4 とそれ以外の代表的な CYP 分子種の基質で P-gp 基質を数え上げると、前者は283個中78個、後者は266個中24個であった。これは Jaccard-Tanimoto 類似度 0.145、0.041 に相当し、明らかに P-gp 基質と CYP3A4 基質との相同性が高いことが示された。

(2) PXR とリガンドとの相互作用に関する構造活性相関解析：PXR の作動薬および拮抗薬に関する情報をテキストマイニングにより収集するとともに、PubChem Bioassay データベースより PXR 作動薬/非作動薬に関する情報を取得した。これらを合わせ、最終的に PXR 作動薬270個、非作動薬248個からなるデータセットを作成した。ADMET Predictor 分子記述子により主成分分析を行い、化合物空間での作動薬と非作動薬の分布を評価したところ、両者の間に特徴的な違いは認められず、マクロな分子構造にほとんど違いがないことが示された。

データセットを訓練用とテスト用に分け、訓練用データセットを使って再帰分割解析により作動薬/非作動薬を分類する決定木を作成した(図1)。テストデータを用いて外部予測評価を行ったところ、感度および特異度は68%、74%であり、構造的に多様な化合物に対して PXR 作動薬か否かを有効に分

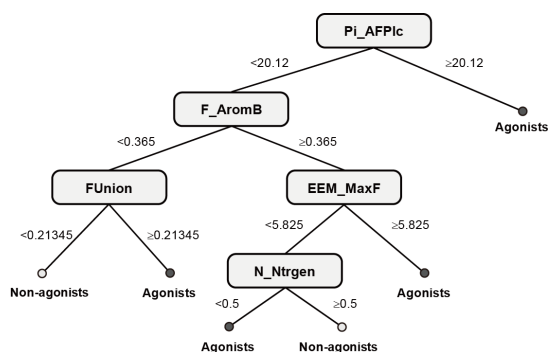


図1 PXR アゴニストを識別するための決定木モデル

EEM_MaxF は maximum sigma Fukui index、F_AromB は芳香族結合率、FUnion は pH 7.4 分子型分率、N_Ntrgen は分子中窒素原子数、Pi_AFPlc は炭素原子上 pi Fukui(+) index の総和を表す。

類できることが確認された。

一方、PXR 作動薬分類の決定木に関し、各ノードでの分類基準を見ると、電子に関わる電荷記述子が選択されていた。これはリガンド-受容体間結合に相互作用のような結合が重要と推測される。分類基準となる代表的な分子記述子に関して作動薬と非作動薬を比較すると、電気的に中性で脂溶性が高い化合物のほうが PXR 作動薬になりやすい傾向にあった。PXR のリガンド結合部位の構成アミノ酸はほとんど疎水性アミノ酸であり、本結果は極めて妥当なものと言える。

(3) CYP3A4 誘導を介して起こる薬物間相互作用の予測：併用薬によって体内動態変化が生じる薬物間相互作用は、臨床薬物治療で大きな問題となっている。代謝酵素の変動により起こることが多いが、細胞レベルでの生化学反応である酵素誘導による薬物間相互作用の予測は極めて困難とされてきた。ヒト肝細胞での酵素誘導データを基に in vitro-in vivo 補外が行われるが、通例は定常状態での AUC 変化率の予測しか行われない。間接効果モデルに基づく動的モデルも試みられているが、本研究では、より実体に近い系として CYP3A4 の転写・翻訳の両過程を考慮した誘導モデルの開発に取り組んだ。

まず、リファンピシンをヒト肝細胞に作用させた際の mRNA 発現量および酵素活性に関するデータを網羅的に収集した。このデータに対して、転写・翻訳過程を考慮した酵素誘導モデルを当てはめ、パラメーターを算出した。この際、細胞のロット間変動が大きい点を考慮し、拡張最小二乗法解析を用いて酵素誘導パラメーターとその変動を推定した。推定パラメーターからは酵素誘導が定常状態に到達するのに6日以上かかることが示唆された。また、CYP3A4 の消失半減期を推定したところ 0.028h^{-1} となり、経験的に提唱されてきた 0.03h^{-1} に非常に近い値が得られた。

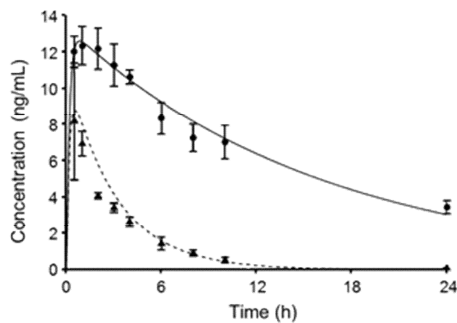


図2 リファンピシン併用時におけるアルプラゾラムの血中濃度推移予測

単剤投与時(○)およびリファンピシン併用時(□)におけるアルプラゾラム経口投与後の血中濃度の実測値であり、曲線はそれぞれに対する予測曲線を表す。アルプラゾラムの動態に関するパラメータは単剤投与時の血中濃度に当てはめ計算を行うことで推定した。

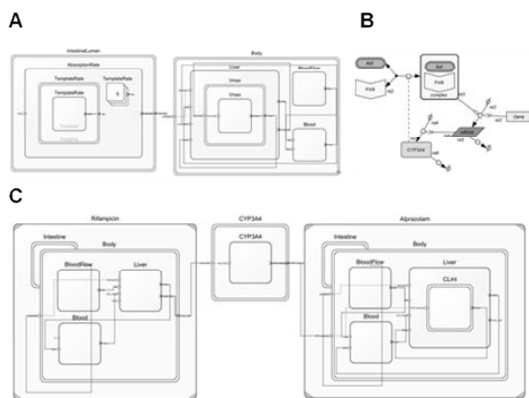


図3 リファンピシンによる CYP3A4 誘導および薬物間相互作用モデル

A:リファンピシン PBPK モデル, B: CYP3A4 誘導ダイナミクスモデル, C:リファンピシンによる CYP3A4 誘導ダイナミクスを考慮した薬物間相互作用モデル

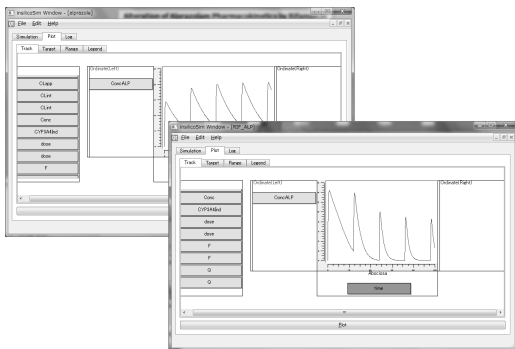


図4 Flint を用いた薬物間相互作用ダイナミクスのシミュレーション

得られた汎化性の高い酵素誘導パラメータを用いて、rifampicin および種々の薬物の PBPK モデルと連成シミュレーションすることで、CYP3A4 基質薬物に対する薬物間相互作用の予測を試みた。非定常状態での予測性を確かめるために、rifampicin を 4 日間前投与での alprazolam の併用実験の結果を解析した。alprazolam の消失に対する

CYP3A4 寄与率($f_{mCYP3A4}$)が 0.75 であることを考慮し、rifampicin による CYP3A4 の動的誘導に伴うクリアランス変動に基づき、alprazolam の血中濃度をシミュレーションしたところ、臨床データとの極めて良好な一致が認められた(図2)。また、その他の CYP3A4 基質薬物についても、rifampicin 併用による定常状態 AUC 減少率が良好にシミュレーションできることが確認された。

さらに、本新学術領域研究において多階層生体モデリング・シミュレーション環境として開発された PhysioDesigner を用い、各薬物の PBPK モデルを Physiology Hierarchy Markup Language (PHML) 形式で実装した(図3)。一方、CellDesigner を用いて System Biology Markup Language (SBML) 形式で保存した酵素誘導モデルを用いて、PHML 形式の PBPK モデルとの連成シミュレーションが可能なることも確認した(図4)。このように、これらの薬物動態シミュレーターを統一プラットフォーム上に再現したことにより、心臓電気現象に対する薬物応答などシステムレベルでの様々な PKPD シミュレーションを実現する道が拓かれた。

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 13 件)

K. Yano, S. Mita, K. Morimoto, T. Haraguchi, H. Arakawa, M. Yoshida, F. Yamashita, T. Uchida, T. Ogihara, Multiple linear regression analysis indicates association of P-glycoprotein substrate or inhibitor character with bitterness intensity, measured with a sensor. J. Pharm. Sci., 査読有, 104, 2015, in press

DOI:10.1002/jps.24232

T. Atobe, M. Mori, F. Yamashita, M. Hashida, H. Kouzuki, Artificial neural network analysis for predicting human percutaneous absorption taking account of vehicle properties. J. Toxicol. Sci., 査読有, 40, 2015, 277-294

DOI:10.2131/jts.40.277

H. Babazada, F. Yamashita, S. Yanamoto, M. Hashida, Self-assembling lipid modified glycol-split heparin nanoparticles suppress lipopolysaccharide-induced inflammation through TLR4-NF- κ B signaling. J. Control. Release, 査読有, 194, 2014, 332-340

DOI:10.1016/j.jconrel.2014.09.011

H. Babazada, F. Yamashita, M. Hashida, Suppression of experimental arthritis with self-assembling

glycol-split heparin nanoparticles via inhibition of TLR4-NF- κ B signaling. *J. Control. Release*, 査読有, 194, 2014, 295-300

DOI:10.1016/j.jconrel.2014.09.015

吉田秀哉、山下富義、薬物代謝酵素の誘導に基づく薬物間相互作用の予測、*Drug Delivery System*, 査読無, 29, 2014, 417-425

P. Buchwald, F. Yamashita, Bilinear model for the size-dependency of the CYP3A4 inhibitory activity of structurally diverse compounds. *Mol. Inform.*, 査読有, 33, 2014, 8-14

DOI:10.1002/minf.201300132

S. Yoshida, F. Yamashita, A. Ose, K. Maeda, Y. Sugiyama, M. Hashida, Automated extraction of information on chemical-p-glycoprotein interactions from the literature. *J. Chem. Inf. Model.*, 査読有, 53, 2013, 2506-2510

DOI:10.1021/ci4003188

F. Yamashita, Y. Sasa, S. Yoshida, A. Hisaka, Y. Asai, H. Kitano, M. Hashida, H. Suzuki, Modeling of rifampicin-induced CYP3A4 activation dynamics for the prediction of clinical drug-drug interactions from in vitro data. *PLoS One*, 査読有, 8, 2013, e70330

DOI:10.1371/journal.pone.0070330

S. Wada, T.Kano, S. Mita, Y. Idota, K. Morimoto, F. Yamashita, T.Ogihara, The role of inter-segmental differences in P-glycoprotein expression and activity along the rat small intestine in causing the double-peak phenomenon of substrate plasma concentration. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 査読有, 28, 2013, 98-103

DOI:10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-005

J.B. Brown, S. Niijima, A. Shiraiishi, M. Nakatsui, Y. Okuno, Chemogenomic approach to comprehensive predictions of ligand-target interactions: a comparative study. *Prpceedings of IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM2012)*, Workshop on Pharmaco-informatics for Drug Discovery (PIDD2012), 査読有, 1, 2012, 136-142

S. Yoshida, F. Yamashita, T. Itoh, M. Hashida, Structure-activity relationship modeling for predicting interactions sith pregnane X receptor by recursive partitioning. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 査読有, 27, 2012, 506-512

DOI:10.2133/dmpk.DMPK-11-RG-159

S. Niijima, A. Shiraiishi, Y. Okuno, Dissecting kinase profiling data to predict activity and understand cross-reactivity of kinase inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.*, 査読有, 52, 2012, 901-912

DOI:10.1021/ci200607f

[学会発表](計 23 件)

山下富義、酒井千賀、橋田 充、In vitro-in vitro 補外により in vivo 動態試験のサンプリングコストを低減できるか? 日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 26 日、神戸サンボホール(兵庫県) 呉林なごみ、村山 尚、太田亮作、山下富義、鈴木純二、金丸和典、飯野正光、櫻井 隆、2 型リアノジン受容体の不整脈原性変異は CICR 活性と細胞内 Ca²⁺ 動態にどのような影響を及ぼすか? 第 8 8 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 20 日、名古屋国際会議場(愛知県)

山下富義、薬物動態学的相互作用の予測を目指した多階層生体モデリング、第 8 8 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 20 日、名古屋国際会議場(愛知県)

山下富義、Hasan Babazada, 酒井千賀、橋田 充、自己組織化ヘパリン誘導体の抗炎症作用と構造活性相関、第 42 回構造活性相関シンポジウム、2014 年 11 月 14 日、くまもと森都心プラザ(熊本県)

山下富義、情報科学的アプローチによる薬物動態の予測、第 57 回薬学会関東支部会大会、2013 年 10 月 26 日、帝京大学薬学部(東京都)

山下富義、多階層生体機能モデリング・シミュレーションプラットフォームを利用した酵素誘導型薬物間相互作用シミュレーターの開発、第 29 回 Population Pharmacokinetics 研究会、2013 年 10 月 11 日、慶應義塾大学日吉キャンパス(神奈川県)

山下富義、Impact and application of data mining in adme researches、第 28 回日本薬物動態学会年会、2013 年 10 月 9 日、タワーホール船堀(東京都)

吉田秀哉、藤田淳人、山下富義、橋田 充、遺伝的数式プログラミング法を用いた CYP3A4 阻害活性に関する構造活性相関解析、第 28 回日本薬物動態学会年会、2013 年 10 月 9 日、タワーホール船堀(東京都)

F. Yamashita, Automated information extraction and structure-activity relationship analysis of cytochrome P450 substrates. 9th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting conference, 2013 年 5 月 14 日, Orland, Florida(USA)

藤田淳人、山下富義、橋田 充、遺伝的数式プログラミング法による CYP3A4

阻害活性予測モデルの構築、日本動物実験代替法学会第 25 回大会、2012 年 12 月 7 日、慶應義塾大学薬学部（東京都）吉田秀哉、山下富義、尾瀬 淳、前田和也、杉山雄一、橋田 充、P-glycoprotein 輸送基質に関する構造活性相関解析、日本動物実験代替法学会第 25 回大会、2012 年 12 月 7 日、慶應義塾大学薬学部（東京都）

Y. Sasa, F. Yamashita, M. Hashida, Prediction of drug-drug interactions with rifampicin based on dynamics of induction of cytochrome P450 3A4, 第 28 回 Population Pharmacokinetics 研究会, 2012 年 9 月 8 日, 臨床研究情報センター（兵庫県）

S. Niijima, A. Shiraishi, Y. Okuno, Dissecting kinase profiling data to predict activity and understand cross-reactivity of kinase inhibitors. 3rd Strasbourg Summer School in Chemoinformatics, 2012 年 6 月 25 日, Strasbourg(France)

A. Shiraishi, S. Niijima, Y. Okuno, Chemical genomic analysis of cross-reactivity in endogenous GPCR-mediated pathways. 3rd Strasbourg Summer School in Chemoinformatics, 2012 年 6 月 25 日, Strasbourg(France)

吉田秀哉、山下富義、橋田 充、再帰分割法を用いた化合物 / Pregnane X receptor 間相互作用に関する構造活性相関解析、日本薬理学会第 27 年会、2012 年 5 月 24 日、神戸国際会議場（兵庫県）

F. Yamashita, In silico pharmacokinetics: from QSAR to PK Modeling. 1st HD Physiology International Symposium: Integrative Multi-level Systems Biology for In silico Cardiology and Pharmacokinetics, 2012 年 1 月 21 日, 東京大学（東京都）

S. Yoshida, F. Yamashita, M. Hashida, Chemoinformatic Modeling for Discriminating Pregnane X Receptor Activators. 1st HD Physiology International Symposium: Integrative Multi-level Systems Biology for In silico Cardiology and Pharmacokinetics, 2012 年 1 月 20-21 日, 東京大学（東京都）

Y. Sasa, F. Yamashita, M. Hashida, Pharmacokinetic Modeling Considering Dynamics of Induction of Drug Metabolizing Enzymes. 1st HD Physiology International Symposium: Integrative Multi-level Systems Biology for In silico Cardiology and Pharmacokinetics, 2012 年 1 月 20-21 日, 東京大学（東京都）

⑳ F. Yamashita, S. Yoshida, M. Hashida,

In Silico Prediction of Pregnane X Receptor Activators by Classification Tree Model. The 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, 2011 年 12 月 1 日, 京王プラザホテル（東京都）

㉑ 新島 聡、白石 慧、奥野恭史、キナーゼの大規模ケミカルゲノミクス情報を利用した活性特異的モチーフの抽出と阻害剤活性予測、第 39 回構造活性相関シンポジウム、2011 年 11 月 28 日、東京理科大学（千葉県）

〔図書〕(計 1 件)

浅井義之、山下富義、羊土社、Dr.北野のゼロから始めるシステムバイオロジー 第 10 講 PhysioDesigner による生理機能の多階層モデル構築とシミュレーション、2015、189

〔その他〕

ホームページ等

http://dds.pharm.kyoto-u.ac.jp/Dds_Home/index.htm

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下富義 (YAMASHITA FUMIYOSHI)
京都大学・薬学研究科・准教授
研究者番号：30243041

(2)研究分担者

新島 聡 (NIIJIMA SATOSHI)
京都大学・薬学研究科・助教
研究者番号：30456834
(平成 23、24 年度)

猪口明博 (INOBUCHI AKIHIRO)

関西学院大学・理工学部・准教授
研究者番号：70452456
(平成 25、26 年度)

(3)連携研究者

奥野恭史 (OKUNO YASUSHI)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：20283666

伊藤貴之 (ITOH TAKAYUKI)

お茶の水女子大学・人間文化創成科学研究科・教授
研究者番号：80401595