

令和元年9月11日現在

機関番号：32525

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08378

研究課題名(和文)プロドラッグ変換酵素の臓器特異的発現と代謝モデル細胞系の構築

研究課題名(英文) Organ-specific expression of prodrug converting enzyme and construction of metabolic model cell line

研究代表者

細川 正清 (Hosokawa, Masakiyo)

千葉科学大学・薬学部・教授

研究者番号：70181500

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)：本研究においては、変換酵素別のプロドラッグ代謝モデル臓器細胞を作成するとともに、実際にプロドラッグの合成を行うことで、プロドラッグの構造と変換酵素の構造活性相関の検討も試みた。プロドラッグ変換酵素発現細胞と新規策定したプロドラッグである、アトルバスタチンプロドラッグ、インドメタシンプロドラッグ、ハロペリドールプロドラッグの代謝活性化を検討した結果、構造あるいは電子密度の違いにより、加水分解活性が変化することを明らかにし、構造活性相関に関わる新規の知見を得た。この結果は、臨床医薬品開発におけるリード化合物の最適化に伴う構造活性相関の知見として、プロドラッグ設計に関する有用な知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究の結果、構造、あるいは電子密度の違いにより、加水分解活性が変化することを明らかにし、さらに置換基の違いによる加水分解活性の変化を明らかにし、構造活性相関に関わる新規の知見を得た。したがって、臨床医薬品開発におけるリード化合物の最適化に伴う構造活性相関の知見として、各臓器で効率的に代謝活性化されるプロドラッグ設計に関する有用な知見が得られ、新規創薬に有用な知見を与えるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we also attempted to study the structure-activity relationship between the structure of the prodrug and the converting enzyme by creating a prodrug metabolism model organ cell for each converting enzyme and actually synthesizing the prodrug. As a result of examining metabolic activation of atorvastatin prodrugs, indomethacin prodrugs, and haloperidol prodrugs, which are prodrugs that express prodrug conversion enzymes and newly formulated prodrugs, hydrolytic activity changes depending on differences in structure or electron density. To obtain new findings related to structure-activity relationships. As a result of this result, useful knowledge on prodrug design was obtained as knowledge of structure-activity relationship accompanying optimization of lead compounds in clinical drug development.

研究分野：薬物動態学

キーワード：カルボキシルエステラーゼ プロドラッグ 臓器特異的 アトルバスタチンプロドラッグ インドメタシンプロドラッグ ハロペリドールプロドラッグ

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

1. 研究開始当初の背景

現在、プロドラッグの開発において生体内の主要な変換酵素である carboxylesterase (CES), butyrylcholinesterase (BuChE), arylacetamidodeacetylase (AADAC), cholesterolesterase (CholE) および paraoxonase (PON) の種差、臓器差が大きな問題となっている。そこで本研究では、この問題を解決するために、それぞれの変換酵素について、ヒトと動物間での基質特異性の差異を調べることにより、変換酵素別にヒト型モデル動物の可能性を探ることが出来る。また、DNA メチル化、マイクロ RNA による発現抑制や特異的転写因子の差異を調べる事により、臓器特異的発現機構についても明らかにすることが出来る。この結果、変換酵素別のプロドラッグ代謝モデル臓器細胞の作成が可能となり、研究当初から、これを用いることにより新規プロドラッグの迅速な開発が可能となると考えて検討を行ってきた。

2. 研究の目的

プロドラッグの変換酵素の中の代表である CES は、エステルやアミド結合を有する化合物を効率良く加水分解することから、近年バイオアベイラビリティの改善や副作用の軽減を目的として開発されてきたプロドラッグの代謝活性化において、極めて重要な役割を果たしている。ヒトにおいては、主要なアイソザイムである CES1 ファミリーと CES2 ファミリーの間にはプロドラッグの構造に基づいた明確な基質特異性の差異がある。例えば CES1 は肝臓のほかには肺や脳毛細血管内皮細胞にも発現しているが、小腸上皮粘膜細胞および腎臓には発現していない。CES の臓器特異的発現は、生体内での代謝活性化部位を特定できるため、プロドラッグ創薬においては極めて重要な意味を持つものと考えられている。また、これまでのプロドラッグの研究が、既に市販されている薬物を中心に行ってきたため、構造活性相関を調べる場合に限界が見られた。

そこで本研究においては、変換酵素別のプロドラッグ代謝モデル臓器細胞を作成するとともに、実際にプロドラッグの合成を行うことで、プロドラッグの構造と変換酵素の構造活性相関の検討も試みた。プロドラッグ変換酵素発現細胞と新規策定したプロドラッグである、アトルバスタチンプロドラッグ、インドメタシンプロドラッグ、ハロペリドールプロドラッグの代謝活性化を検討した結果、構造あるいは電子密度の違いにより、加水分解活性が変化することを明らかにし、構造活性相関に関わる新規の知見を得た。この結果は、臨床医薬品開発におけるリード化合物の最適化に伴う構造活性相関の知見として、プロドラッグ設計に関する有用な知見が得られた。

3. 研究の方法

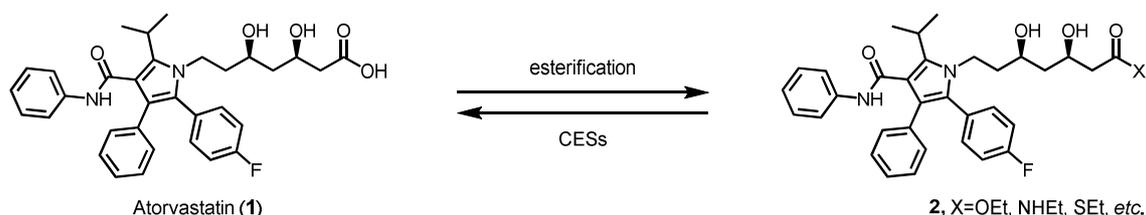
アトルバスタチン、インドメタシン、ハロペリドールを基本骨格とし、エステルやアミド、チオエステル誘導体を合成した。それらを CES、AADAC および PON 存在下で加水分解し、代謝物の量を HPLC で定量した。ヒト CE1A1, CeS2A1, ヒト AADAAC、hito PON3、マウス mCES1 およびカニクイザル mfCES1 については、各々の肝臓より cDNA クローニングし、pTarget ベクターに組換えした cDNA を、Trans IT-293 試薬で HEK293 細胞に transfection し、72 時間後に細胞を採取したものをを用いた。

4. 研究成果

1) アトルバスタチンプロドラッグ

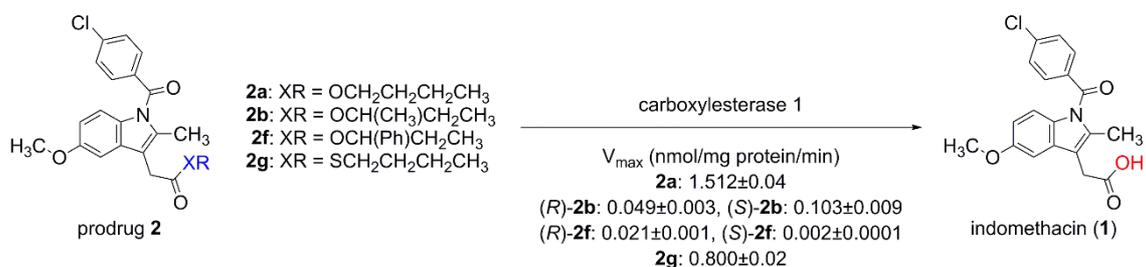
アトルバスタチンプロドラッグの研究において、hCES1 では、メチルエステルまたはエチルエステルにおいては高い活性が見られたが、炭素鎖が長くなるにつれて、鎖長依存的に活性は低下した。また、mCES1 は、炭素数による加水分解活性の変化はほぼ確認されず、hCES1 に比べ、分子サイズを認識しにくい可能性が示唆された。そして、mfCES1 はメチルエステルにおいて最も高い活性を示したものの、エチルエステルからブチルエステルにかけては若干の増加が見られた。ペンチルエステルからデシルエステルにかけて活性は減少し、hCES1 とは異なる鎖長特異性を持つことが確認された。種を通じて CES1 は、メチルエステルの加水分解活性が最も高く、それ以外のエステルにおいてはブチルエステルにおいて比較的高い活性を持つことが示唆された。次に電子密度について、ヘキサフルオロイソプロピル (HFP) とイソプロピル

を比較したところ、HFPの方が、hCES1では2.4倍、mCES1では6.6倍、mfCES1では4.5倍ほど活性が高くなった。結果としてhCES1の方が、mCES1やmfCES1よりもフルオロ基による活性の変化が少ないことが確認できた。この結果より加水分解速度は、基質の構造および電子密度に依存することが明らかになった。



さらに、アトルバスタチンのラクトン環を有するプロドラッグに関しては、PON3により効率的に活性化されることが、初めて、明らかとなった。

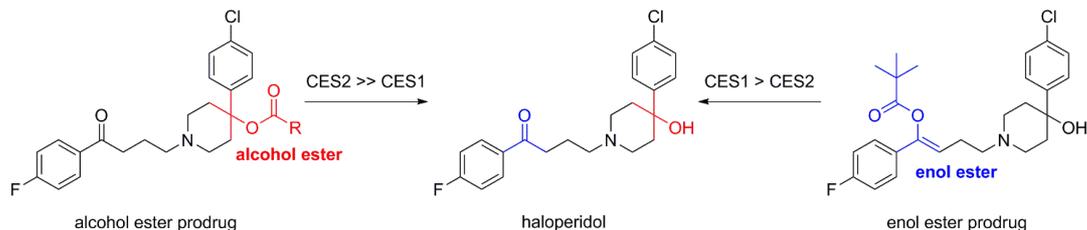
2) インドメタシンプロドラッグ



インドメタシンプロドラッグの合成において、体内でのプロドラッグの効率的な活性化のために代謝酵素に対するプロドラッグの親和性を考慮することが必要であると考えて実験を行った。これまで、化学的性質を考慮して多くのプロドラッグが合成されてきたが、代謝酵素の基質認識能などの生物学的性質を考慮した構造設計に関する研究はほとんどなされていない。ここでは、ヒトカルボキシルエステラーゼ1 (hCES1) によって代謝的に活性化されるインドメタシンプロドラッグの合成を行った。合成したプロドラッグを、ヒト肝ミクロソーム (HLM)、ヒト腸ミクロソーム (HIM) およびヒトカルボキシルエステラーゼ1 (CES1A1) の溶液中で加水分解反応を行い、これらのプロドラッグの加水分解活性を評価し、解明するために酵素化学的パラメータを調べた。CES1A1の基質認識能はインドメタシンエステルの立体障害および立体化学に応じて大きく変化することが見出された。さらに、CES1A1によって触媒される加水分解反応において、化学的に高い反応性を有するn-ブチルチオエステルの V_{\max} 値は、n-ブチルエステルのそれよりも有意に低かった。これらの結果、インドメタシンエステルプロドラッグが、ヒト小腸ではなくヒト肝臓で効率良く加水分解されるので、肝臓において特異的な代謝活性化の可能性を有することを示した。CES1A1のインドメタシンプロドラッグの加水分解活性はエステルの隣接炭素上の立体障害に応じて大きく変化することを示唆した。さらに、CES1A1のキラル認識能力に関する新たな知見が得られた。単純なアルキルエステルでも、R体とS体の加水分解活性には2.1倍の差があった。1-フェニルプロピルエステル**2f**のようなフェニル基を持つ基質では、R体とS体の加水分解活性の間に10.2倍の加水分解活性の差があった。チオエステルの V_{\max} 値はエステルのそれよりも低い、チオエステルはエステルのそれよりも高い CL_{int} 値を有する。これらの結果は、エステルプロドラッグの構造と代謝活性化速度との間に関する重要な情報を提供する。

3) ハロペリドールプロドラッグ

水酸基またはカルボニル基を化学修飾した2種類のハロペリドールプロドラッグを合成し、それらの代謝活性化能をヒト肝マイクロソーム (HLM) 溶液、ヒト小腸マイクロソーム (HIM) 溶液およびヒト組換え体において評価した。カルボキシルエステラーゼ (hCES) 溶液。HLM 溶液中のアルコールエステルプロドラッグの代謝活性化率は、hCES2 溶液中のそれと類似しており、ハロペリドールペンタノエートおよびハロペリドールヘキサノエートは、合成されたアルコールエステルプロドラッグにおいて高い代謝活性化率を示した。さらに、ハロ



ペリドールアセテートおよびハロペリドール2-メチルブタン酸はハロペリドールデカノアートと同じくらいゆっくり加水分解された。小鎖または分岐鎖を有するハロペリドールプロドラッグが徐放用のプロドラッグとして有用であることが示唆された。HLM 溶液中のエノールエステルプロドラッグの代謝活性化速度は、hCES1 溶液中のそれと類似しており、hCES2 によって代謝的に活性化されたアルコールエステルプロドラッグとは異なる挙動をすることが見出された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

(査読付き学術論文)

Kenta Mizoi, Masato Takahashi, Sachiko Sakai, Takuo Ogihara, Masami Haba and Masakiyo Hosokawa.

Structure-activity relationship of atorvastatin derivatives for metabolic activation by hydrolases, *Xenobiotica*. 2019, in press, doi: 10.1080/00498254.2019.1625083

Yasuhiro Uno, Yoshiyuki Igawa, Maori Tanaka, Kayoko Ohura, Masakiyo Hosokawa, Teruko Imai. Analysis of carboxylesterase 2 transcript variants in cynomolgus macaque liver. *Xenobiotica*. 2019 Feb;49(2):247-255. doi: 10.1080/00498254.2018.1435927. Epub 2018 Apr 27. PubMed PMID: 29384423.

Yuma Ishizaki, Tomomi Furihata, Yusuke Oyama, Kayoko Ohura, Teruko Imai, Masakiyo Hosokawa, Hidetaka Akita, Kan Chiba. Development of a Caco-2 Cell Line Carrying the Human Intestine-Type CES Expression Profile as a Promising Tool for Ester-Containing Drug Permeability Studies. *Biol Pharm Bull*. 2018;41(5):697-706. doi: 10.1248/bpb.b17-00880. PubMed PMID: 29709907.

Yasuhiro Uno, Shotaro Uehara, Hassan MD Mahadhi, Kayoko Ohura, Masakiyo Hosokawa, Teruko Imai. Molecular characterization and polymorphisms of butyrylcholinesterase in cynomolgus macaques. *J Med Primatol*. 2018 Jun;47(3):185-191. doi: 10.1111/jmp.12342. Epub 2018 Mar 24. PubMed PMID: 29573432.

Masato Takahashi, Tomohiro Ogawa, Hiroshi Kashiwagi, Fumiya Fukushima, Misa Yoshitsugu, Masami Haba, Masakiyo Hosokawa. Chemical synthesis of an indomethacin ester prodrug and its metabolic activation by human carboxylesterase 1. *Bioorg Med Chem Lett*. 2018 Apr 1;28(6):997-1000. doi: 10.1016/j.bmcl.2018.02.035. Epub 2018 Feb 21. PubMed PMID: 29503023.

Yasuhiro Uno, Yoshiyuki Igawa, Maori Tanaka, Kayoko Ohura, Masakiyo Hosokawa, Teruko Imai. Analysis of

carboxylesterase 2 transcript variants in cynomolgus macaque liver. *Xenobiotica*. 2018 Apr 27:1-9. doi: 10.1080/00498254.2018.1435927. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29384423.

Toshimoto K, Tomaru A, Hosokawa M, Sugiyama Y. Virtual Clinical Studies to Examine the Probability Distribution of the AUC at Target Tissues Using Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling: Application to Analyses of the Effect of Genetic Polymorphism of Enzymes and Transporters on Irinotecan Induced Side Effects. *Pharm Res*. 2017 Aug;34(8):1584-1600. doi: 10.1007/s11095-017-2153-z. Epub 2017 Apr 10. PubMed PMID: 28397089; PubMed Central PMCID: PMC5498655.

Kabeza T, Matsumura W, Iwao T, Hosokawa M, Matsunaga T. Functional analysis of carboxylesterase in human induced pluripotent stem cell-derived enterocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Apr 22;486(1):143-148. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.014. Epub 2017 Mar 8. PubMed PMID: 28285137.

Mizoi K, Takahashi M, Haba M, Hosokawa M. Synthesis and evaluation of atorvastatin esters as prodrugs metabolically activated by human carboxylesterases. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016 Feb 1;26(3):921-923. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.12.069. Epub 2015 Dec 19. PubMed PMID: 26750256.

〔学会発表〕(計 10 件)

高橋正人、小川梯央、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、金沢 2018.3

堺 早知子、溝井 健太、高橋 正人、巾 正美、宇野 泰宏、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 2018.3

Masato Takahashi, Tomohiro Ogawa, Hiroshi Kashiwagi, Fumiya Fukushima, Misaki Yoshitsugu, Masami Haba,
Masakiyo Hosokawa. Chemical synthesis of an indomethacin ester prodrug and its metabolic activation by human
carboxylesterase 1 International Symposium on MDO and the 33rd Annual Meeting of JSSX, Kanazawa, Japan, 2018.10

壁谷 知樹、松村 若菜、岩尾 岳洋、細川 正清、松永 民秀
ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞におけるカルボキシルエステラーゼの機能解析
日本薬学会第 137 年会仙台 2017.3

石崎 裕馬、降幡 知巳、大浦 華代子、今井 輝子、細川 正清、秋田 英万
エステル型プロドラッグ消化管吸収評価能の向上に向けたヒト小腸型 CES 発現 Caco-2 細胞の樹立
日本薬学会第 137 年会仙台 2017.3

堺 早知子、溝井 健太、高橋 正人、巾 正美、細川 正清
カルボキシルエステラーゼにより代謝活性化されるアトルバスタチンプロドラッグの設計
日本薬学会第 137 年会仙台 2017.3

Sachiko Sakai, Kenta Mizoi, Masato Takahashi, Masami Haba, Yasuhiro Uno, Teruko Imai, Masakiyo Hosokawa
Species Differences of mouse, cynomolgus monkey and human carboxylesterase using atorvastatin esters with various
steric and electronic properties The 32nd JSSX Annual Meeting, Tokyo, 2017.11

今井輝子、井川佳之、西澤遙、大浦華代子、宇野泰宏、細川正清 新規カニクイザルカルボキシルエステラーゼ 2 分子
種の加水分解特性と肝臓および小腸における発現の個体差

日本薬学会第 136 年会 横浜 2016 年 4 月

坂本圭、溝井健太、高橋正人、巾正美、細川正清 新規アトルバスタチンプロドラッグの合成と評価
日本薬学会第 136 年会 横浜 2016 年 4 月

Masato Takahashi, Kenta Mizoi, Masami Haba, Masakiyo Hosokawa Investigation of substrate specificity for
carboxylesterase using ester derivatives of atorvastatin
31st JSSX Annual Meeting, Matsumoto, 2016

Yuma Ishizaki, Tomomi Furihata, Ohura Kayoko, Teruko Imai, Masakiyo Hosokawa, Hidetaka Akita, Kan, Chiba
Development of Caco-2 cells carrying the human small intestine-type carboxylesterase expression profile as a new tool
for ester-containing drug absorption studies
31st JSSX Annual Meeting, Matsumoto, 2016

〔図書〕(計 5 件)

細川正清 医療薬物代謝学 第 2 版(編集 山崎浩史、小澤正吾) 2.2.2. c 「カルボキシルエステラーゼ」2018 年 1
月 テコム

細川正清 衛生薬学 第 6 版(編集永沼章、姫野誠一郎、平塚明) 9.1.5 「異物代謝に影響を及ぼす因子」2018 年 2
月 丸善出版

細川正清 薬学領域の病原微生物学・感染症学・化学療法学 第 3 版(編集:増澤俊幸、河村好章)第 3 編第 3 章-3.9
「抗菌薬の副作用と相互作用」p318-324 2016 年 2 月 廣川書店

細川正清 コンパス生物薬剤学改訂第二版(編集:岩城正宏、伊藤智夫)第 5 章代謝 pp91-131 2016 年 3 月 南
江堂

細川正清 スタンダード薬学シリーズ II 第 6 巻医療薬学 IV 薬の生体内運命 第 4 章「代謝」SBO14-17 2016 年
11 月 東京化学同人

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/read0170466>

6. 研究組織

(1)研究分担者 無し

(2)研究協力者 無し

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。