

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790174

研究課題名(和文) 遺伝子発現抑制薬ピロール-イミダゾールポリアミドの構造-薬物動態相関モデルの構築

研究課題名(英文) Quantitative structure-pharmacokinetic relationship analysis of pyrrole-imidazole polyamides in rats

研究代表者

青山 隆彦 (Aoyama, Takahiko)

日本大学・薬学部・助教

研究者番号：70384633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ピロール-イミダゾール(PI)ポリアミドは任意の二本鎖DNAに入り込み、遺伝子の発現を制御する化合物群である。任意の遺伝子の発現を制御するため、様々な疾患の治療薬開発が可能と期待される。本研究では、PIポリアミドによる創薬開発の基板として、PIポリアミドの薬物体内動態と分子構造の関係を調べた。PIポリアミドの分布容積および血漿タンパク結合率は分子構造から予測できる可能性が示唆された。クリアランスと分子構造の関係は、検出されなかった。より詳細な検討を行うため、さらにPIポリアミドの体内動態情報を集積する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Pyrrole-imidazole (PI) polyamides regulate gene expression to bind specific nucleotide sequences in the minor groove of double-helical DNA with high affinity. PI polyamides are potential therapeutic drugs. In this study, we investigate the quantitative structure-pharmacokinetics relationships of PI polyamides in rats. The distribution volume and plasma protein binding ratio of PI polyamides might be predicted by the molecular structure. The relationships between the clearance and the molecular structure were not detected. To describe the pharmacokinetic characteristics of PI polyamides, further study is needed.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：ピロール・イミダゾールポリアミド 薬物動態

様式 C - 19、F - 19、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特異的に DNA の塩基に結合するピロール-イミダゾールポリアミド(PI ポリアミド)は、遺伝子発現抑制薬としての医薬品開発が期待されている化合物である。PI ポリアミドによる特異的な塩基の認識は、Py/Py ペア、-アラニン( )/ ペアおよび /Pyペアは A/T または T/A ペアを、Py/Im ペアおよび /Im ペアは C/G ペアを、Im/Py ペアは G/C ペアをそれぞれ標的とする。特異的に DNA の塩基に結合する PI ポリアミドは、エンハンサーや転写因子結合部位のプロモーター領域を標的とすることにより遺伝子発現を抑制する。細胞レベルにおいて、PI ポリアミドは、細胞分裂の調節に関与するオーロラキナーゼ A および B のプロモーター活性、mRNA 発現量およびタンパク発現量を低下させた。オーロラキナーゼは、がん細胞において過剰発現していることから、抗がん剤としての PI ポリアミドが期待されている。ラットにおいては、新生内膜過形成および新生内膜肥厚に関与するレクチン様酸化 LDL 受容体-1(LOX-1)を標的とした PI ポリアミドが、血管内皮細胞の障害時における内膜肥厚および血管狭窄を抑制した。LOX-1 は動脈硬化と関係があることが報告されているため、動脈硬化予防の効果が期待されている。MMP-9 は良性腫瘍や非侵襲性腫瘍と比較して、悪性がんが増加していることが知られている。このことから MMP-9 を阻害する PI ポリアミドは、がんの侵襲や転移を阻害する治療薬としても期待されている。これらの他、PI ポリアミドは様々な薬効薬理が報告されていることから、新規の遺伝子発現抑制薬となりうる。

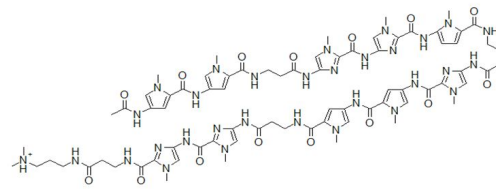
2. 研究の目的

分子構造が異なる様々な PI ポリアミドのラットにおける体内動態を速度論的に解析し、薬物体内動態の特徴を調べる。さらに、PI ポリアミドの分子構造と薬物体内動態の相関関係を調べ、分子構造から薬物体内動態を予測する構造-薬物体内動態相関モデルを構築する。

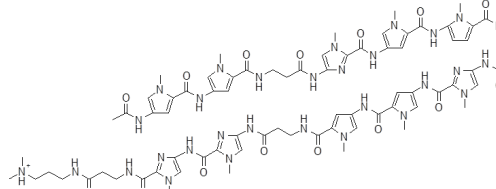
3. 研究の方法

(1) 薬物動態パラメータの算出

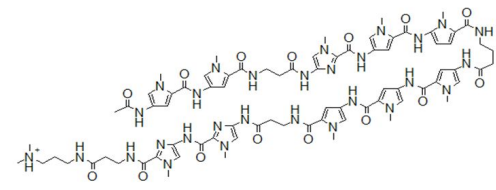
PI ポリアミド 7 化合物 (分子量 1422-1912, 図 1) について、ラットを用い、化合物の薬物動態学的特徴を表す分布容積、クリアランス、血漿タンパク結合率を算出した。分布容積およびクリアランスはモーメント解析法により算出した。血中濃度時間曲線下面積は台形法により算出した。消失相の傾きおよび最終採血点の血中 PI ポリアミド濃度より無限時間まで血中濃度時間曲線下面積を外挿した。無限時間まで外挿した血中濃度時間曲線下面積を投与量で除し、これをクリアランスとした。1 次モーメント曲線下面積を台形法により算出した。無限時間まで外挿した 1



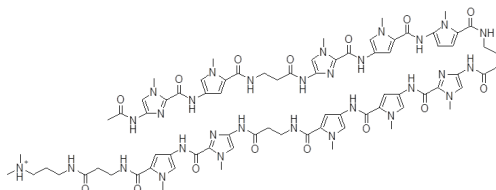
PI Polyamide A (MW: 1668.75)



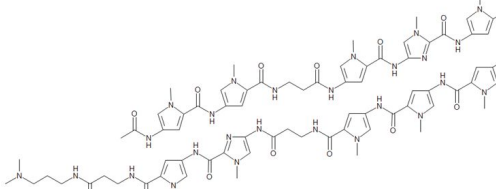
PI Polyamide B (MW: 1667.76)



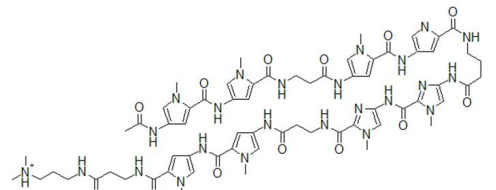
PI Polyamide C (MW: 1666.77)



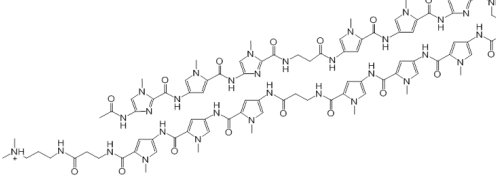
PI Polyamide D (MW: 1666.75)



PI Polyamide E (MW: 1665.8)



PI Polyamide F (MW: 1421.53)



PI Polyamide G (MW: 1912.02)

図 1 ピロール-イミダゾールポリアミドの分子構造と分子量

次モーメント曲線下面積を血中濃度時間曲線下面積で除し、これを平均滞留時間とした。平均滞留時間とクリアランスの積を分布容積とした。血漿タンパク結合率は超遠心法により求めた。ラット血漿に PI ポリアミドを添加し、4、440000gにて140分間の遠心分離を行った。三層に分離した血漿の中間層のPI ポリアミド濃度を測定し、これを遊離型濃度とした。総濃度と遊離型濃度の比を遊離型分率とし、遊離型分率から血漿タンパク結合率を算出した。

#### (2) 分子記述子の作成

それぞれのPI ポリアミドの分子構造から、化学構造式ドローイングソフトウェア ChemDraw Pro version 11.0.1 を用いて MOL ファイルを作成した。これを ADMET 物性予測ソフトウェア ADMET Predictor に読み込み、分子構造の特徴を表す分子記述子を算出した。

#### (3) 構造 - 薬物動態相関解析

ADMET Predictor が算出した分子記述子と、分布容積、クリアランス、血漿タンパク結合率との相関係数をそれぞれ算出し、相関係数が0.8以上または-0.8以下を示す分子記述子を以降の解析に用いた。分布容積、クリアランス、血漿タンパク結合率をそれぞれ従属変数、分子記述子を独立変数とし、以下に示すモデルを当てはめた。

$$P = a_1 \cdot D^2$$

ただし、 $P$ は薬物動態パラメータ、 $a_1$ および $a_2$ は係数、 $D$ は分子記述子を表す。モデルの当てはめは薬物動態解析プログラム NONMEM7 を用いて行った。NONMEM によって算出される目的関数値、モデル診断散布図を指標に薬物動態パラメータと関係する分子記述子を探索した。

#### 4. 研究成果

これまでに報告した高速液体クロマトグラフィーによる血中 PI ポリアミド濃度測定系を最適化し、PI ポリアミド7化合物の血中濃度を測定した。血中濃度 - 時間データより分布容積、クリアランス、および血漿タンパク結合率を算出した。算出した薬物動態パラメータは、化合物ごとに異なる値であった。

図2に分子記述子 Pi\_Q6 と PI ポリアミド分布容積の関係を示す。PI ポリアミドの分布容積は、電子密度に関する分子記述子である Pi\_Q6 と強い関係が認められた。図3に分子記述子 T\_Radc、EEM\_F6、および Pi\_FPL3 と血漿タンパク結合率の関係を示す。血漿タンパク結合率は、分子幾何構造に関する分子記述子である T\_Radc、原子反応に関する分子記述子である EEM\_F6、Pi\_FPL3 と強い関係が認められた。クリアランスと関係が強い分子記述子は認められなかった。

クリアランスと関係が強い分子記述子を探索するため、文献より得られたデータを併

合し解析する手法を試みた。ピロールまたはイミダゾールを分子構造に含み、ラットを対象とし、静脈内投与後の血中濃度データを用いてモーメント解析によりクリアランスを算出している文献をPubMedにより検索した。条件に従う16化合物について、ChemDraw Pro version 11.0.1 を用いて MOL ファイルを作成した。これを ADMET Predictor に読み込み、分子記述子を算出した。16化合物とPI ポリアミドの分子記述子を比較すると、16化合物の分子記述子の分布は、PI ポリアミドの分子記述子の分布と大きく異なり、併合解析には不適であった。さらに、クリアランスと分子構造の関係を調べるため、ヒト肝ミクロソームおよびラット肝ミクロソームを用いPI ポリアミドの酸化代謝実験を行い、酵素速度論パラメータを用いた構造薬物動態相関解析を試みたが、本研究に用いた実験条件では、反応時間依存的な基質濃度の減少は認められなかった。PI ポリアミドは、血漿タンパク結合率が高値を示す傾向が認められたため、今後は、反応液中タンパク濃度を低値とするなど、実験条件の更なる検討が必要と考えられる。

PI ポリアミドのラットにおける分布容積および血漿タンパク結合率は、分子構造の設計段階から予測することが可能と考えられる。しかし、クリアランスに関しては分子構造と関係する情報は得られなかった。より詳細な検討を行うため、さらにPI ポリアミドの体内動態情報を集積する必要がある。

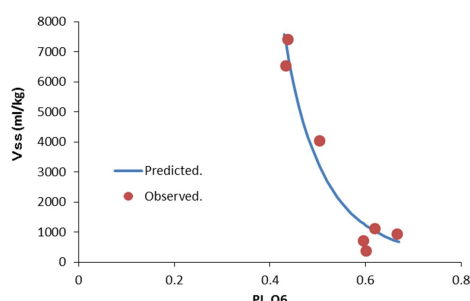


図2 分子記述子 Pi\_Q6 と分布容積の関係点は実測値、曲線はモデル予測値を示す。

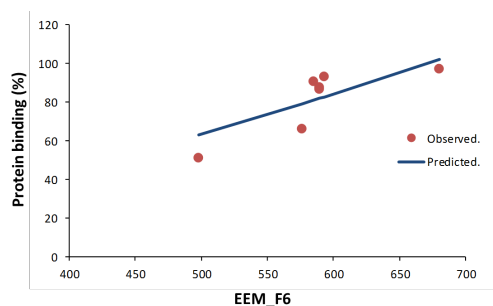
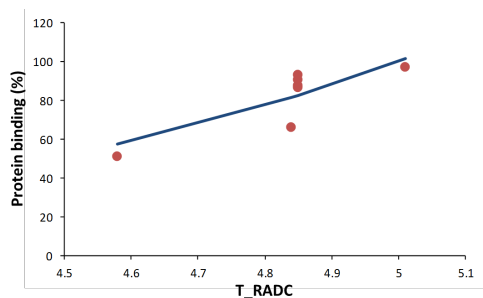
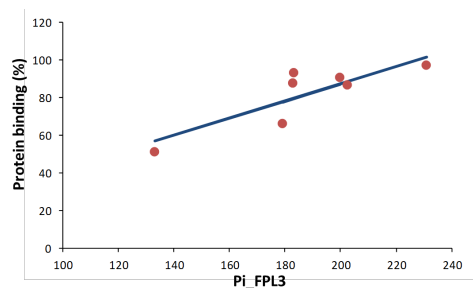


図3 分子記述子とタンパク結合率の関係  
点は実測値、曲線はモデル予測値を示す。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

青山隆彦、荻野知美、上野高浩、福田昇、永瀬浩喜、松本宜明：ラットにおけるピロール-イミダゾールポリアミドの定量的構造-薬物動態相関解析、日本薬学会第134年会(熊本)2014年3月30日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

<http://www.pha.nihon-u.ac.jp/page.jsp?id=1956>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

青山 隆彦 (AOYAMA TAKAHIKO)

日本大学・薬学部・助教

研究者番号：70384633

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし